

**REVIEW ARTIKEL: PRODUKSI ENZIM ASPARAGINASE DENGAN
TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN**

Melarsari Mulyati
Streptokinase

Erlin Elisabeth H., Dr. Tina Rostinawati, M. Si., Apt.
Jl. Raya Bandung Sumedang KM 21, Jatinaangor 45363
Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran
erlinelisabeth13@gmail.com

Abstrak

Trombosis merupakan pembekuan lokal atau pembekuan darah di bagian sistem sirkulasi. Sering kali trombosis menyebabkan penyakit infark miokard akut maupun stroke iskemik. Pengobatan efektif dalam menangani penyakit tersebut adalah dengan pemberian agen trombolitik, dalam hal ini adalah streptokinase. Akibat besarnya kebutuhan streptokinase, metode produksi melalui rekombinan DNA menjadi pilihan utama. Dari berbagai metode, terdapat beberapa asal bakteri yang dapat memproduksi streptokinase, di mana yang paling sering adalah *Streptococcus sp* dengan vector ekspresi, sel inang, dan media kultur berbeda yang nantinya menghasilkan streptokinase rekombinan dengan massa molekuler dan konsentrasi berbeda dan dapat dibandingkan.

Kata kunci: Streptokinase, Rekombinan DNA.

Mimi 6

Abstract

*Thrombosis is local clotting or blood clots in parts of the circulatory system. Often thrombosis causes acute myocardial infarction and ischemic stroke. The effective treatment of this disease is by giving thrombolytic agents, in this case is streptokinase. Because of the large need for streptokinase, the production method through recombinant DNA is the main choice. Of the various methods, various kinds of bacteria can produce streptokinase, and the most common are *Streptococcus sp* with vectors expression, host cells, and different culture media used to produce recombinant streptokinase.*

Keywords: Streptokinase, Recombinant DNA.

PENDAHULUAN

Trombosis, penyumbatan pembuluh darah dengan gumpalan, dapat menyebabkan infark miokard akut dan stroke iskemik. Dua penyakit tersebut di sebagian besar negara dikenal sebagai penyakit darurat penyebab utama kematian. Selain intervensi bedah untuk menghilangkan atau melewati penyumbatan, atau pembentukan pembuluh darah kolateral untuk menyediakan pasokan darah baru, satu-satunya pengobatan yang tersedia adalah pemberian agen trombolitik untuk melarutkan bekuan darah (Mahmoudi, *et al*, 2012).

Streptokinase adalah salah satu obat yang disetujui FDA pertama yang diperkenalkan sebagai agen terapi untuk infark miokard akut dan termasuk dalam daftar *World Health Organization Model List of Essential Medicines* (Ghosh, *et al.*, 2012). Obat ini memungkinkan peningkatan tingkat kelangsungan hidup pasien melalui resolusi bekuan darah dan reperfusi pada jaringan jantung yang terluka. Namun, banyak efek samping seperti mual, muntah, hipotensi, hipertensi,

flebitis, nyeri tekan lokal, perdarahan, bradikardia, takikardia, aritmia dan demam juga telah dilaporkan (Taheri, *et al.*, 2015).

Streptokinase merupakan protein yang diproduksi oleh berbagai *strain* streptokokus beta-hemolitik yang memiliki massa molar 47 kDa dan terdiri dari 414 residu asam amino. Streptokinase menunjukkan aktivitas maksimum pada pH sekitar 7,5 dan pH isoelektriknya adalah 4,7. Protein ini merupakan polipeptida rantai tunggal yang bergabung dengan *proactivator plasminogen* (Ali, *et al.*, 2014). Kompleks enzimatis ini merupakan agen fibrinolitik tidak langsung yang berinteraksi dengan plasminogen dan membentuk kompleks aktif dengan aktivitas protease yang mengubah plasminogen menjadi plasmin (Aslanabadi, *et al.*, 2018).

Pada tahun 1947, Dr. Sherry melaporkan penemuan streptokinase dari *Streptococcus* yang dapat digunakan untuk mengobati gangguan pembekuan darah. Pada 1952, Johnson dan Tillet berhasil menggunakan streptokinase untuk melisiskan gumpalan intravascular

Motsum (dalam → ekstrak!)
Ekskret!

Eliminasi
Pengaruh
Streptokinase

yang diinduksi secara artifisial di pembuluh darah telinga kelinci. Pada 1955, Johnson dan Tillet melakukan lisis bekuan darah dengan streptokinase pada pasien secara intravena. Tahun 1959, Ruegsegger berhasil melisis gumpalan intrakoroner dengan streptokinase. Setelah percobaan yang berhasil pada hewan, Boucek dan Murphy menggunakan streptokinase pada manusia. Boucek dan Murphy menyuntikkan streptokinase ke dalam sinus koroner (dikaterisasi melalui arteri brakialis kanan) dari pasien yang mengalami oklusi arteri koroner. Pada tahun 1966, Schmutzler dan rekan penulis di Jerman menerbitkan salah satu uji coba terbesar saat itu, yang melibatkan 558 pasien. Mereka melaporkan tingkat kematian 14,1% pada pasien yang diobati dengan streptokinase, dibandingkan dengan 21,7% pada kelompok kontrol (Ghosh, *et al.*, 2012).

Percobaan klinis awal dengan streptokinase mengungkapkan efektivitas pada fungsi ventrikel dan pengurangan ukuran infark dan mortalitas, tetapi obat tersebut tidak

memiliki spesifisitas fibrin, waktu paruh plasma pendek, hipersensitif tinggi dan memerlukan dosis tinggi dalam penggunaannya. Selain itu, streptokinase yang diproduksi secara alami oleh berbagai jenis streptokokus hemolitik menghasilkan beberapa produk toksik yang tidak diinginkan, mis. deoxyribonucleases, streptolysin atau hyaluronidase, dan protease, yang membuat proses pemurnian protein yang diinginkan sulit. Streptokinase tidak hanya mengaktifkan plasminogen pada gumpalan, tetapi juga plasminogen sistemik, yang dapat menginduksi hiperplasminemia, menipisnya fibrinogen yang bersirkulasi (hingga 20%) dan faktor koagulasi V dan VIII. Dikarenakan hal tersebut, streptokinase memerlukan modifikasi struktural (Ghosh, *et al.*, 2012).

Dalam suatu penelitian, streptokinase rekombinan diuji dan dibandingkan aktivitasnya dengan supositoria fenilefrin dalam penanganan penyakit hemoroid akut. Hasil menunjukkan bahwa adanya keuntungan signifikan penggunaan supositoria streptokinase rekombinan

(dosis 200000 IU) dibandingkan dengan supositoria fenilefrin dengan tingkat respon 36% lebih besar dan lima hari lebih cepat. (Bernal *et al.*, 2014)

POKOK BAHASAN

Metode Penelitian

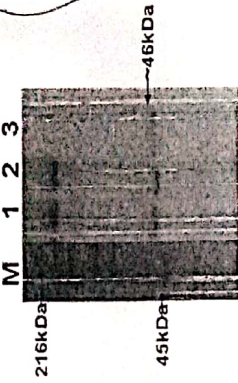
Metode pengumpulan data untuk penulisan *review* artikel ini

Hasil

Tabel Perbandingan Metode Ekspresi Streptokinase dengan Rekombinan DNA:

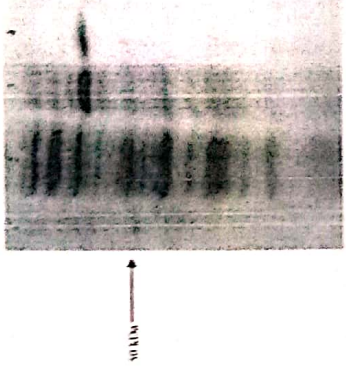
dilakukan dengan studi literatur. Adapun studi literatur dilakukan dengan menelaah artikel dan jurnal ilmiah yang dipublikasi secara nasional maupun internasional dalam 10 tahun terakhir, yaitu antara tahun 2009-2019, terkait manfaat dan metode pembuatan Streptokinase dengan teknik DNA Rekombinan.

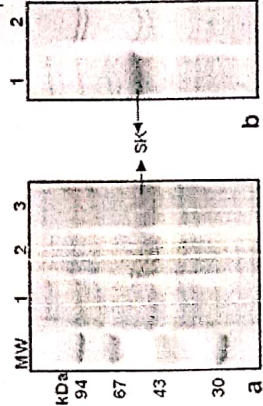
↓
panduan
jurnal?
Jawaban

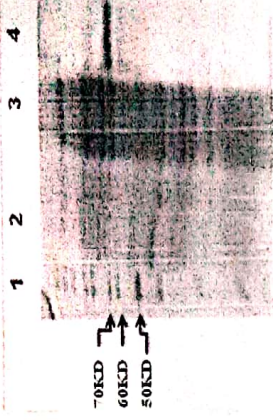
No.	Mikroorganisme yang digunakan	Vektor Ekspresi	Sel Inang	Media Kultur	Pemurnian dan Kuantifikasi	Hasil	Referensi
1.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	pPROEX HT	<i>Pichia pastoris</i> SMD1168	<i>Yeast Peptone</i> <i>Dextrose</i> (YPD)	Pemurnian dengan kolom afinitas pengkelat logam, kromatografi filtrasi gel, dan kuantitas ditentukan Metode Bradford.	Konsentrasi Streptokinase rekombinan: 0,267 µg / ml. Massa molekuler: 46kDa. Hasil dengan SDS PAGE: 	(Assiri, et al., 2014).

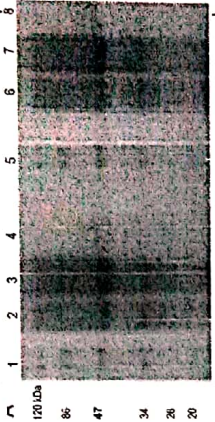
12 font
→ W

Uraian Uji: denaturasi?

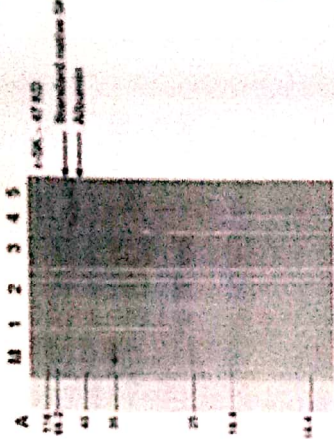
2.	<p><i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>.</p>	<p>pET32a</p>	<p><i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)</p>	<p>Luria Bertani (LB) Agar dan Kaldu</p>	<p>Pemurnian dengan kolom Ni-NTA. Protein didialisis dua kali dengan <i>Phosphate Buffer Saline</i> (PBS) (pH 7.2). Kualitas dan kuantitas dianalisis dengan SDS-PAGE 15% dan Metode Bradford.</p>	<p>Konsentrasi: 470 mg/L. Massa molekuler: kisaran 60kDa.</p>  <p>(Mahmoudi, <i>et al.</i>, 2010).</p> <p>Keterangan: 1: Marker; 2: Sel tanpa induksi dengan vektor; 3: Sel terinduksi dengan IPTG; 4: Ekstrak protein setelah kromatografi Ni-NTA.</p>
----	---	---------------	---	--	--	--

3.	<i>Streptococcus equisimilis</i> .	pET-23d	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).	Luria Bertani (LB) dan Media Sintetik.	<p>Kuantifikasi dengan Metode Bradford dan Analisis Densitometrik dari pita Streptokinase. Kadar dinyatakan dalam mg/L kaldu fermentasi dan mg/g sel kering.</p>	<p>Eksprei Streptokinase 47 kDA. Pada medium LB, konsentrasi dan hasil spesifik SK adalah 80 mg/L dan 74 mg/g dan nilai Streptokinase dalam media sintetis adalah 74 mg/L dan 68,5 mg/g.</p> 	<p>Keterangan: A: 1: Lisat sel utuh dari sel yang tidak diinduksi; 2, 3: lisat sel utuh setelah 4 jam induksi dalam media LB; 3: lisat sel utuh setelah 4 jam induksi dalam media sintetis. B: 1: fraksi larut dari sampel yang diinduksi; 2: fraksi tidak</p>
----	------------------------------------	---------	-------------------------------------	--	--	--	--

4.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	pET32a	<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	LB agar dan kaldu.	<p>Pemurnian dengan kolom Ni-NTA. Protein didialisis dua kali dengan <i>Phosphate Buffer Saline</i> (PBS) (pH 7.2). Kualitas dan kuantitas dianalisis dengan SDS-PAGE 15% dan Metode Bradford.</p>	<p>Massa molekul: 65kDa. Konsentrasi Streptokinase: 3.2 mg/L. Kondisi terbaik ekspresi dicapai ketika OD600 nm = 0,8 selama 4 jam.</p>  <p>(Molae, <i>et al.</i>, 2013).</p> <p>Keterangan: 1: Marker; 2: Sebelum induksi; 3: Setelah induksi; 4: Elusi Streptokinase rekombinan dari kolom Ni-NTA.</p>
----	-------------------------------	--------	------------------------------------	--------------------	--	--

5.	<p><i>Streptococcus equisimilis</i> (GCS-9542 dan GCS-S87).</p>	<p>pQE30</p>	<p><i>E. coli</i> M15.</p>	<p>Tidak disebutkan.</p>	<p>SDS PAGE 12% dan Uji Kromogenik.</p>	<p>Massa molekul: 47 kDa dan 44 kDa. Konsentrasi untuk rSK9942: 0.53 mg/mL dan rSK87: 0.59 mg/mL.</p>  <p>(Keramati, <i>et al.</i>, 2013).</p> <p>Keterangan: 1 dan 5: Marker; 2 dan 3: ekstrak protein total dari <i>E. coli</i> M15 / pSK87; 6 dan 7: ekstrak protein total <i>E. coli</i> M15 / pSK9542; 3 dan 7: diinduksi IPTG; 2 dan 6; tidak diinduksi; 4 dan 8 protein murni rSK87 dan rSK9542.</p>
----	---	--------------	----------------------------	--------------------------	---	--

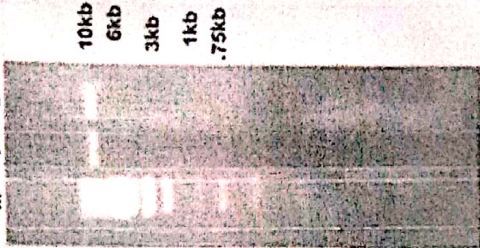
6.	<p><i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>, grup C (ATCC 12388)</p>	pET32a	<p>Media dengan kombinasi: ekstrak jamur, tripton, glukosa, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, agar nutrient, MgSO₄ (total 25mL).</p>	<p><i>E. coli</i> BL21 (DE3)</p>	<p>Pemurnian dengan kolom Ni-NTA. Protein didialisis dua kali dengan <i>Phospate Buffer Saline</i> (PBS) (pH 7.2). Kualitas dan kuantitas dianalisis dengan SDS-PAGE 15% dan Metode Bradford.</p>	<p>Dalam media 2.4% glukosa terdapat Streptokinase rekombinan 800 µg/mL.</p>	<p>(Mahmoudi, <i>et al.</i>, 2012).</p>
----	---	--------	--	----------------------------------	---	--	---

7.	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Sal/MarEg</i>	pPROEX™ HT	Luria Bertani	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> DH5α	SDS PAGE 12%	<p>Massa molekuler: 47kDa.</p>  <p>(Sohaimy, <i>et al.</i>, 2011).</p>
<p>Keterangan:</p> <p>1: <i>E. coli</i> yang tidak diinduksi; 2: <i>E. coli</i> yang diinduksi IPTG untuk ekspresi r-SK; 3) fraksi peneucian dari pemurnian afinitas; 4: fraksi elusi (r-SK); 5: standar Sreptokinase asli</p>						

Escherichia coli

E. coli

r-SK

8.	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 49399	pTarget	Luria Bertani Agar	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Gel Elektroforesis Agarosa	 <p>Keterangan: M: Marker; 1 dan 2: pTargetTsK.</p>	(Gangwar, <i>et al.</i> , 2010).
----	---	---------	-----------------------	--------------------------------------	-------------------------------	--	----------------------------------

<p>9. Gen sintetis yang mengkode protein SK rekombinan ~48kDa (ID GenBank: ADV18975.1). Dibuak 3 tag SK: SK-His, GST-SK, Npu_cIntein-SK.</p>	<p>pT7CFE-Chis</p>	<p>Luria Bertani Kaldu</p>	<p><i>Escherichia coli</i> DH₅α</p>	<p>Kolom Ni-NTA dan SDS PAGE.</p>	<p>Npu_cIntein-SK: 52 kDa. Hasil SK sendiri, lebih sedikit dibandingkan GST-SK.</p>	<p>(Tran, et al., 2017).</p>

10.	Plasmid pSK99 yang mengandung gen streptokinase rekombinan	pAMJ399 dengan promotor P170.	<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	Media M17.	SDS PAGE.	<p>Massa molecular sekitar 47 kDa.</p> <p>(Bera, <i>et al.</i>, 2015).</p>
-----	--	-------------------------------	----------------------------------	------------	-----------	--

Pembahasan

Streptokinase merupakan salah satu terapi fibrinolitik yang dipercaya efektif dan digunakan untuk pengobatan berbagai kelainan dan penyakit pembuluh darah, misalnya emboli paru, trombosis vena dalam, dan infark miokard. Di mana penyakit ini merupakan penyakit darurat penyebab kematian. Oleh karena itu produksi streptokinase sangat diperlukan dan dibutuhkan dalam jumlah banyak demi memenuhi kebutuhan pasar. Salah satu cara efektif produksi streptokinase adalah dengan teknologi DNA rekombinan.

Teknologi DNA rekombinan memainkan peran penting dalam meningkatkan kondisi kesehatan manusia. Teknologi DNA rekombinan meliputi perubahan bahan genetik di luar organisme untuk memperoleh karakteristik yang ditingkatkan dan diinginkan. Teknologi DNA rekombinan meliputi penggabungan bersama DNA molekul dari dua spesies yang kemudian dimasukkan ke dalam organisme inang untuk menghasilkan kombinasi genetik. Teknologi ini

melibatkan penyisipan fragmen DNA dari berbagai sumber yang memiliki urutan gen yang diinginkan melalui vektor yang sesuai.

Dalam proses produksi dengan DNA rekombinan beberapa aspek penting yang harus diperhatikan adalah mikroorganisme asal dengan streptokinase yang akan diekspresi, vektor ekspresi, sel inang dan media kultur. Proses teknologi DNA rekombinan dilakukan dengan pemilihan DNA yang akan dimasukkan ke dalam vektor ekspresi. Selanjutnya, DNA tersebut dipotong dengan enzim restriksi dan dilakukan ligasi DNA ke vektor dengan *DNA Ligase*. Vektor kemudian dimasukkan ke sel inang yang kompeten.

1. Assiri, *et al.*, pada tahun 2014 melakukan produksi streptokinase rekombinan dengan asal bakteri *Streptococcus pyogenes*. Bakteri yang digunakan diisolasi dari pasien faringitis pada suatu rumah sakit. Selanjutnya dilakukan amplifikasi gen streptokinase menggunakan DNA bakteri.

Kemudian, kloning gen streptokinase dan transkripsi dilakukan *in vitro* dengan vektor ekspresi pPROEX HT dan sel inang ragi *Pichia pastoris* SMD1168 dan media kultur *Yeast Peptone Dextrose* (YPD). Dilakukan pemurnian dan kuantifikasi streptokinase yang dihasilkan dengan kolom afinitas pengkelat logam, kromatografi filtrasi gel, dan Metode Bradford. Uji protein Bradford digunakan untuk mengukur konsentrasi total protein dalam sampel. Prinsip uji ini adalah bahwa pengikatan molekul protein dengan pewarna Coomassie dalam kondisi asam menghasilkan perubahan warna dari coklat menjadi biru. Metode Bradford mengukur keberadaan residu asam amino basa, arginin, lisin dan histidin, yang berkontribusi terhadap pembentukan kompleks pewarna protein. Selain itu, pada hasil rekombinan

streptokinase dilakukan juga pengujian aktivitas trombolitik protein rekombinan streptokinase dibandingkan dengan streptokinase komersial standar. Vektor ekspresi pPROEX HT diketahui merupakan tipe plasmid ekspresi, promotor Trc, ukuran 4779 pb, dan resisten terhadap ampicillin. Kuantitas rekombinan streptokinase yang dihitung dengan Metode Bradford adalah 0,267 µg/ ml dan massa molekuler dengan SDS PAGE 46kDa. SDS-PAGE (elektroforesis gel natrium dodesil sulfat-poliakrilamid) biasanya digunakan di laboratorium untuk pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya. Pada hasil rekombinan streptokinase yang didapat juga menunjukkan aktivitas trombolitik *in vitro* yang tinggi sebanding dengan standar komersial SK,

menunjukkan bahwa rekombinan streptokinase berpotensi untuk digunakan dalam terapi trombolitik dan diproduksi dalam skala besar.

2. Mahmoudi, *et al.*, pada tahun 2010 melakukan produksi rekombinan streptokinase dengan asal bakteri *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Vektor ekspresi yang digunakan adalah pET32a, dengan tipe plasmid untuk ekspresi, tingkat ekspresi tinggi, ukuran 5900 pb, dan resisten terhadap ampisilin. Pada penelitian ini digunakan sel inang *Escherichia coli* BL21 (DE3) dengan media kultur Luria Bertani (LB) Agar dan Kaldu dengan Ampisillin dan Kloramfenikol. Ekspresi gen diinduksi dengan isopropyl-thio-P-D-galactoside (IPTG). Pemurnian rekombinan streptokinase dilakukan dengan kolom Ni-NTA. Ni-NTA Agarose adalah resin afinitas bermuatan nikel yang dapat digunakan untuk

memurnikan protein rekombinan yang mengandung urutan polyhistidine (6xHis). Prinsip kerja kolom afinitas Ni-NTA memerlukan peranan Tag Histidine. Tag Histidine memiliki afinitas terhadap ion nikel atau kobalt yang telah diimmobilisasi dengan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan chelator yang tergabung dalam fase diam. Untuk elusi, jumlah berlebih dari senyawa yang dapat bertindak sebagai ligan ion logam, seperti imidazol, digunakan. Selanjutnya protein didialisis dua kali dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (pH 7.2). Kualitas dan kuantitas dianalisis dengan SDS-PAGE 15% dan Metode Bradford. Didapatkan hasil streptokinase dengan konsentrasi 470 mg/L dan massa molekuler kisaran 60kDa. Untuk menentukan aktivitas, dilakukan analisis *immunoblotting* untuk

menentukan antigen dari rekombinan streptokinase pada tikus yang terimunisasi dengan streptokinase komersial, analisis dilakukan dengan *western-blotting*. Data memperlihatkan streptokinase rekombinan dideteksi sebagai antigen pada tikus terimunisasi. Rekombinan streptokinase memperlihatkan epitope yang sama dengan bentuk awal antigen yang ada.

3. Goyal, *et al.*, pada tahun 2009 melakukan produksi rekombinan DNA dengan bakteri asal *Streptococcus equisimilis*. Vektor yang digunakan adalah pET-23d, dengan tipe plasmid untuk ekspresi, promotor AmpR, T7, tingkat ekspresi tinggi, dan resisten terhadap ampicillin. Sel inang yang digunakan *Escherichia coli* BL21 (DE3), dan media Luria Bertani (LB) dan Media Sintetik. Kuantifikasi dilakukan dengan Metode Bradford dan Analisis

Densitometrik dari pita Streptokinase. Analisis densitometri adalah pengukuran kuantitatif kerapatan optis pada bahan yang peka terhadap cahaya, seperti kertas foto atau film fotografi, akibat paparan cahaya. Pada hasil didapatkan ekspresi Streptokinase 47 kDA. Pada medium LB, konsentrasi dan hasil spesifik SK adalah 80 mg/L dan 74 mg/g dan nilai Streptokinase dalam media sintesis adalah 74 mg/L dan 68,5 mg/g.

4. Molaee, *et al.*, 2013 melakukan produksi rekombinan streptokinase dengan asal bakteri *Streptococcus pyogenes*. Vektor ekspresi yang digunakan adalah pET32a, dengan tipe plasmid untuk ekspresi, tingkat ekspresi tinggi, ukuran 5900 pb, dan resisten terhadap ampisilin. Sel inang yang digunakan *Escherichia coli* BL21 (DE3), media kultur LB agar dan kaldu. Untuk pemurnian,

dilakukan dengan kolom Ni-NTA. Protein didialisis dua kali dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (pH 7.2). Kualitas dan kuantitas dianalisis dengan SDS-PAGE 15% dan Metode Bradford. Hasil yang didapatkan merupakan rekombinan streptokinase dengan asasa molekul: 65kDa. Konsentrasi Streptokinase: 3.2 mg/L. Kondisi terbaik ekspresi dicapai ketika OD600 nm = 0,8 selama 4 jam. Pada penelitian ini juga dilakukan *immunoblotting analysis*. Data menunjukkan bahwa protein rekombinan streptokinase yang dihasilkan memiliki epitop yang sama dengan bentuk alami antigen ini.

5. Keramati, *et al.*, 2013 melakukan produksi streptokinase dengan mikroorganisme awal *Streptococcus equisimilis* (GCS-9542 dan GCS-S87) yang didapat dari pasien dengan penyakit

streptococcal non-invasive di Iran. Vektor ekspresi yang digunakan adalah pQE30, dengan tipe plasmid untuk ekspresi, ukuran 4444 pb, dan resisten terhadap ampisilin. Sel inang yang digunakan *E. coli* M15. Pemurnian dan kuantifikasi dilakukan dengan SDS PAGE 12% dan Uji Kromogenik. Uji kromogenik menunjukkan keberadaan analit dalam sampel uji (dalam hal ini streptokinase) melalui perubahan warna terlihat yang diinduksi secara kimia. Pada hasil didapatkan massa molekul: 47 kDa dan 44 kDa. Konsentrasi untuk rSK9942: 0.53 mg/mL dan rSK87: 0.59 mg/mL. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya kemungkinan untuk memproduksi streptokinase rekombinan dari sumber bakteri lokal yang menunjukkan aktivitas sebanding dengan strain standar.

6. Mahmoudi, *et al.*, 2012 melakukan produksi rekombinan streptokinase dengan mikroorganisme awal *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, grup C (ATCC 12388). Vektor ekspresi yang digunakan adalah pET32a. Media kultur yang digunakan adalah media dengan kombinasi: ekstrak jamur, tripton, glukosa, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, agar nutrient, MgSO₄ (total 25mL). Sel inang yang digunakan adalah *E. coli* BL21 (DE3). Pemurnian dilakukan dengan kolom Ni-NTA. Protein didialisis dua kali dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (pH 7.2). Kualitas dan kuantitas dianalisis dengan SDS-PAGE 15% dan Metode Bradford. Dalam media 2.4% glukosa terdapat Streptokinase rekombinan 800 µg/mL.

7. Sohaimy, *et al.*, 2011 melakukan produksi streptokinase rekombinan dengan mikroorganisme awal

Streptococcus sp. SalMarEg. Vektor ekspresi yang digunakan pPROEXTM HT, tipe plasmid untuk ekspresi, ukuran 4779 pb, promotor Trc, dan resisten terhadap ampicillin. Media yang digunakan Luria Bertani dengan sel inang *Escherichia coli* DH₅ α . Analisis dilakukan dengan SDS PAGE 12% dan didapatkan massa molekuler 47kDa yang dapat dimurnikan menggunakan kromatografi pemurnian afinitas *single-step-his-tagged*, dengan pemulihan hampir 80%. Pada penelitian, dilakukan *western blot analysis*. *Western blot* bekerja melalui tiga tahapan, (1) pemisahan berdasarkan ukuran, (2) transfer ke pendukung yang solid, dan (3) menandai protein target menggunakan antibodi primer dan sekunder yang tepat untuk memvisualisasikan. Aktivitas trombolitik rekombinan streptokinase yang dihasilkan

serupa dengan komersial streptokinase, sehingga memberikan kemungkinan produksi lebih untuk rekombinan streptokinase.

8. Gangwar, *et al.*, 2010 melakukan produksi rekombinan protein dengan mikroorganisme asal *Streptococcus pyogenes* ATCC 49399. Vektor ekspresi yang digunakan adalah pTarget, tipe plasmid adalah ekspresi mamalia dengan tingkat ekspresi tinggi, ukuran 5700 pb, dan resisten terhadap ampicillin. Media yang digunakan Luria Bertani Agar. Sel inang yang digunakan adalah *Escherichia coli* DH₅ α . Deteksi gel elektroforesis agarosa. **Elektroforesis DNA** merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang antara

100bp-50 kb tergantung dari konsentrasi gel agarose yang digunakan, medan gerak biasanya horizontal dan mempunyai laju pemisahan lebih cepat.

9. Tran, *et al.*, 2017 melakukan produksi rekombinan streptokinase dengan mikroorganisme awal merupakan gen sintesis yang mengkode protein streptokinase rekombinan ~48kDa (ID GenBank: ADV18975.1). Dibuat 3 tag SK: SK-His, GST-SK, Npu_cIntein-SK. Prinsip penelitian dilakukan dengan menggunakan sistem bebas sel. Secara khusus, sistem sintesis protein bebas sel (CFPS) berdasarkan sel mamalia memberikan metode alternatif untuk produksi banyak protein, termasuk yang mengandung ikatan disulfida, glikosilasi, dan struktur kompleks seperti antibodi monoklonal. Pada penelitian dilakukan produksi streptokinase dalam sistem

bebas-sel menggunakan bioreaktor mini yang diinstrumentasi untuk produksi protein. Digunakan dua tag afinitas yang berbeda untuk tangkapan produk dan membandingkannya dengan teknologi penangkapan intein *tag-free self-cleaving*. Metode pemurnian intein memberikan pemulihan produk rekombinan streptokinase sebesar 86%, dibandingkan dengan 52% untuk protein yang ditandai secara konvensional. Sementara ada peningkatan aktivitas sebanyak 30% pada streptokinase rekombinan murni dibandingkan dengan protein yang ditandai secara konvensional. Vektor ekspresi yang digunakan adalah pT7CFE-Chis, vektor khusus untuk ekspresi mamalia bebas sel, promotor T7, dan resisten ampisilin. Media kultur Luria Bertani kaldu, sel inang *Escherichia coli* DH₅ α . Pemurnian dilakukan dengan Kolom Ni-

NTA dan SDS PAGE. Didapat hasil massa molekular Npu_cIntein-SK sebesar 52 kDa. Hasil SK sendiri, lebih sedikit dibandingkan GST-SK.

10. Bera, *et al.*, 2015 melakukan produksi rekombinan streptokinase dengan nasal streptokinase dari plasmid pSK99 yang mengandung gen streptokinase rekombinan. Vektor ekspresi yang digunakan adalah pAMJ399 dengan promotor P170. Dalam sistem P170, kekuatan induksi berhubungan dengan konsentrasi laktat yang diberikan. Media kultur M17. pH kultur yang rendah membutuhkan jumlah laktat yang lebih rendah untuk induksi. Kelemahan sistem yang utama adalah sulitnya membangun kepadatan sel yang tinggi, namun keterbatasan ini diatasi dengan reactor perfusi atau reactor daur ulang sel. Sel inang *Lactococcus lactis* MG1363. Produksi dan

produktivitas rekombinan streptokinase pada *L. lactis* sebanding dengan yang diperoleh pada kultur *E. coli*. Identifikasi protein streptokinase dengan SDS PAGE menunjukkan massa molecular 47 kDa.

SIMPULAN

Produksi rekombinan streptokinase dapat dilakukan dengan bakteri *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equisimilis*, gen sintetis yang mengkode protein streptokinase, dan plasmid tertentu yang mengandung gen streptokinase rekombinan, di mana dari beberapa jurnal yang diteliti paling banyak menggunakan *Streptococcus sp.* Vektor dan media kultur yang digunakan pun beragam, serta sel inang yang paling sering digunakan adalah *Escherichia coli*. Hasil identifikasi produksi rekombinan streptokinase paling banyak menggunakan SDS PAGE dengan rata-rata massa molekular 47kDa, seperti streptokinase pada umumnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, M. R., Hossain, M. S., Islam, M. A., Arman, S. I., dan Raju, G. S., 2014. Dasgupta, P., dan Noshin, T. F. 2014. Aspect of Thrombolytic Therapy: A Review. *The Scientific World Journal*.
- Aslanabadi, N., Safaie, N., Talebi, F., Dousti, S., dan Entezari-Maleki, T. 2018. The Streptokinase Therapy Complications and Its Associated Risk Factors in Patients with Acute ST Elevation Myocardial Infarction. *Iran J Pharm Res*. 17:53-63.
- Assiri, A. S., El-Gamal, B. A., Hafez, E. E., dan Haidara, M. A. 2014. Production of recombinant streptokinase from *Streptococcus pyogenes* isolate and its potential for thrombolytic therapy. *Saudi Med J*.
- Bera, S., Thillai, K., Sriraman, K., dan Jayaraman, G. 2015. Process strategies for enhancing recombinant streptokinase production in *Lactococcus lactis* cultures using P170 expression system. *Biochemical Engineering Journal*. 93: 94-101.
- Bernal, F. H., Sierra, G. C., Silva, C., Alvarez, K., Cabrera, R., Barreto, A., dan Saura, P. 2014. Recombinant streptokinase vs phenylephrine-based suppositories in acute hemorrhoids, randomized, controlled trial (THERESA-3). *World J Gastroenterol*. 20(6): 1594-1601.
- Gangwar, S., Lakhera, P. L., dan Rai, A. 2010. Amplification and cloning of streptokinase gene in pTarget mammalian expression vector. *Biotechnology International*. 3 (2/3):33-49.
- Ghosh, M., Pulicherla, K. K., Rekha, V. P. B., Venkat Rao, G., dan Sambasiva Rao, K. 2012. A Review on Successive Generations of Streptokinase Based Thrombolytic Agents. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 4. Suppl. 3.

- Goyal, D., Sahni, G., dan Sahoo, D. K. 2009. Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture. *Bioresouce Technology*. 100: 4468-4474.
- Keramati, M., Roohvand, F., Aslani, M., Khatami, S., Aghasadeghi, M., Sadat, M., Memarnejadian, A., dan Motevalli, F.. Screening, Cloning and Expression of Active Streptokinase from an Iranian Isolate of *S.equisimilis* group C in *E. coli*. *Iran J Basic Med Sci*. 16: 620-7.
- Mahmoudi, S., Abtahi, H., Bahador, A., Mosayebi, G., dan Salmanian, A. H. 2010. Production of Recombinant Streptokinase in *E. coli* and Reactivity with Immunized Mice. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 13(8): 380-384.
- Mahmoudi, S., Abtahi, H., Bahador, A., Mosayebi, G., dan Salmanian, A. H, Teymuri, M. 2012. Optimizing of Nutrients for High Level Expression of Recombinant Streptokinase Using pET32a Expression System. *A Journal of Clinical Medicine*. 7: 3.
- Molaei, N., Abtahi, H., dan Mosayebi, G. 2013. Expression of Recombinant Streptokinase from *Streptococcus pyogenes* and Its Reaction with Infected Human and Murine Sera. *Iran J Basic Med Sci*. 16: 985-989.
- Sohaimy, S., Aleem, E., Hafez, E., Esmail, S., Saadani, M., dan Moneim, N. 2011. Expression of recombinant Streptokinase from local Egyptian *Streptococcus* sp. *SalMarEg. African Journal of Biotechnology*. 10(45): 9001-9011.
- Taheri, L., Zargham-Boroujeni, A., Jahromi, M. K., Charkhandaz, M., dan Hojat, M. 2015. Effect of Streptokinase on Reperfusion After Acute Myocardial Infarction and Its Complications: An Ex-Post Facto Study. *Global Journal of Health Science*. Vol. 7, No. 4.
- Tran, K., Gurramkonda, C., Cooper, M. A., Pilli, M., Taris, J. E., Selock, N., Han, T., Tolosa, M.,

Zuber, A., Peñalber-Johnstone, C., Dinkins, C., Pezeshk, N., Kostov, Y., Frey, D., Tolosa, L., Wood, D., dan Rao, G. 2017. Cell-free production of a therapeutic protein: Expression, purification, and characterization of recombinant streptokinase using a CHO lysate. *Biotechnology and Bioengineering*. 115(1), 92–102.