

REVIEW ARTIKEL: PRODUKSI ENZIM STREPTOKINASE DENGAN TEKNOLOGI DNA REKOMBINAN

Erlin Elisabeth Hutapea, Tina Rostinawati

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung Sumedang KM 21, Jatinangor, 45363

erlinelisabeth13@gmail.com

Diserahkan 03/07/2019, diterima 01/08/2019

ABSTRAK

Trombosis merupakan penyumbatan pembuluh darah akibat gumpalan yang dapat menyebabkan infark miokard akut dan stroke iskemik. Pengobatan efektif dalam menangani penyakit tersebut adalah dengan pemberian agen trombolisis, Streptokinase. Akibat besarnya kebutuhan Streptokinase, terutama di negara berkembang, dilakukan produksi melalui Teknologi DNA Rekombinan. Dari berbagai penelitian, bakteri *Streptococcus sp* merupakan sumber utama produksi Streptokinase. Streptokinase rekombinan yang didapatkan beragam, dengan rata-rata massa molekular 47 kDa. Uji aktivitas trombolisis juga dilakukan dengan membandingkan Streptokinase rekombinan dengan Streptokinase komersial dan didapatkan hasil sebanding antar keduanya.

Kata kunci: Trombosis, Trombolisis, Streptokinase, DNA Rekombinan.

ABSTRACT

Thrombosis is a blockage of arteries that can cause acute myocardial infarction and ischemic stroke. The effective treatment for this disease is thrombolysis agent, Streptokinase. These days, the need of Streptokinase increases and Recombinant DNA Technology become an alternative. From various studies, Streptococcus sp. is the main source of Streptokinase production. The recombinant streptokinase obtained varies, with an average molecular mass of 47 kDa. The thrombolysis activity was also carried out by comparing recombinant Streptokinase with commercial Streptokinase and obtaining comparative results between all.

Keywords: Thrombosis, Thrombolysis, Streptokinase, DNA Recombinant.

PENDAHULUAN

Trombosis merupakan penyumbatan pembuluh darah akibat gumpalan yang dapat menyebabkan infark miokard akut dan stroke iskemik. Di sebagian negara, dua penyakit tersebut dikenal sebagai penyakit darurat penyebab utama kematian. Untuk menangani hal tersebut sering kali dilakukan intervensi bedah guna melancarkan kembali pembuluh darah, tetapi hal tersebut sering kali tidak efektif dan satu-satunya pengobatan yang tersedia adalah pemberian agen trombolisis untuk melarutkan bekuan darah (Mahmoudi, *et al*, 2012).

Streptokinase adalah salah satu obat yang disetujui FDA sebagai agen terapi fibrinolitik yang dipercaya efektif dan digunakan untuk pengobatan berbagai kelainan dan penyakit pembuluh darah 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 lisis 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 pertama kali ditemukan oleh Dr. William Smith Tillet, pada tahun 1933, secara kebetulan belaka. Tillet mengamati bahwa *Streptokokus* teraglutinasi dalam tabung reaksi yang mengandung plasma manusia tetapi tidak teraglutinasi dalam tabung dengan serum manusia. Tillet menemukan bahwa hal ini

disebabkan oleh fibrinogen di plasma, yang merupakan faktor pembekuan darah, diadsorpsi oleh permukaan *Streptokokus*. Awalnya Streptokinase digunakan untuk mengatasi eksudat pleura fibrinosa, hemotoraks, dan meningitis tuberkulosis (Sikri dan Bardia, 2007).

Pada tahun 1958, Sol Sherry, yang merupakan murid Tillet, mulai menggunakan streptokinase pada pasien dengan infark miokard akut. Pendekatan inovatif infus streptokinase intrakoroner diprakarsai oleh Rentrop dan rekan pada tahun 1979. Selanjutnya, Gruppo Italiano per la Sperimentazione della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISSI) pada tahun 1986, memvalidasi dan menetapkan Streptokinase untuk penggunaan infark miokard akut (Sikri dan Bardia, 2007).

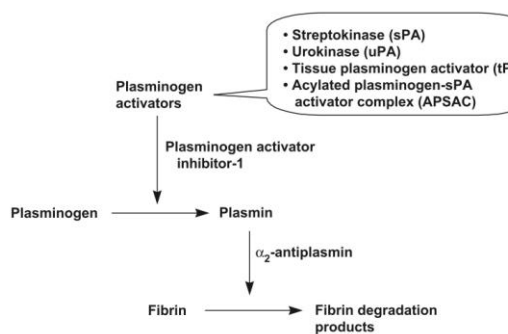
Saat ini, meskipun penggunaan agen aktivator plasminogen jaringan telah banyak ditemukan, Streptokinase tetap penting untuk pengelolaan infark miokard akut terutama di negara berkembang. Oleh karena itu, dilakukan ulasan cara produksi Streptokinase dengan Teknologi Rekombinan DNA.

POKOK BAHASAN

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).

Mekanisme kerja Streptokinase sebagai agen fibrinolitik adalah dengan mengaktifkan plasminogen menjadi plasmin. Plasmin sendiri memiliki aktivitas sebagai penghancur fibrin, yang merupakan protein penggumpal darah (Aslanabadi, *et al.*, 2018).



Gambar 1. Mekanisme kerja Streptokinase (Ali, *et al.*, 2014).

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 pengubahan 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 ke dalam sel inang yang kompeten (Khan, *et al.*, 2016).

Hasil penelusuran produksi Streptokinase dengan teknologi Rekombinan DNA meliputi:

1. 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 ampisilin. 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. 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. Analisis densitometri merupakan 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.

2. Gangwar, *et al.*, 2010 melakukan produksi rekombinan protein dengan mikroorganisme asal *Streptococcus pyogenes* ATCC 49399. Vektor ekspresi yang digunakan adalah pTargeT, dengan tipe plasmid untuk ekspresi mamalia, tingkat ekspresi tinggi, ukuran 5700 pb, dan resisten terhadap ampicilin. Media yang digunakan LB agar. Sel inang yang digunakan adalah *Escherichia coli* DH5 α . Deteksi hasil dengan gel elektroforesis agarosa, didapatkan Streptokinase rekombinan berjumlah 10 kb.
3. Mahmoudi, *et al.*, 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 ampicilin. Pada penelitian ini digunakan sel inang *Escherichia coli* BL21 (DE3) dengan media kultur LB agar dan kaldu yang ditambahkan Ampisillin dan Kloramfenikol. Ekspresi gen diinduksi dengan isopropyl-thio-P-D-galactoside (IPTG). Pemurnian rekombinan Streptokinase dilakukan dengan kolom Ni-NTA. Selanjutnya protein didialisis dua kali dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (pH 7.2). Kualitas dan kuantitas dianalisis dengan Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 15% dan Metode Bradford. Didapatkan hasil Streptokinase dengan konsentrasi 470 mg/L dan massa molekul kisaran 60kDa. Dilakukan analisis *immunoblotting* untuk menentukan antigen dari rekombinan Streptokinase, dan analisis *Western Blot*. Pada tikus diinjeksikan Streptokinase komersial (Behring), dan serum tikus digunakan sebagai antibodi primer. *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. Rekombinan Streptokinase yang telah dimurnikan ditransfer ke membran dan direaksikan dengan antibodi primer. *Blot* dicuci tiga kali dengan TBST dan diinkubasi dengan IgG (dari Bioscience). *Blot* dicuci lagi tiga kali dan reaksi dilakukan dengan diamino Banzidine. Data memperlihatkan rekombinan Streptokinase dideteksi sebagai antigen pada tikus terimunisasi. Rekombinan Streptokinase memperlihatkan epitop yang sama dengan bentuk awal antigen. Rekombinan Streptokinase yang dihasilkan juga dapat menjadi antigen yang menjanjikan untuk diagnosis serologi infeksi Streptokokus grup C pada hewan.
4. 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 ampicilin. Media yang digunakan Luria Bertani dengan sel

- inang *Escherichia coli* DH₅ α . Analisis dilakukan dengan SDS PAGE 12% dan Western Blot dan didapatkan massa molekuler 47kDa yang dimurnikan menggunakan kromatografi pemurnian afinitas *single-step-his-tagged*, dengan pemulihan hampir 80%. Aktivitas trombolitik rekombinan Streptokinase dibandingkan dengan Streptokinase komersial secara in vitro dengan mengambil darah 20 partisipan sehat tanpa sejarah penggunaan terapi antikoagulan. Konsentrasi rekombinan Streptokinase yang digunakan adalah 0,01, 0,008, 0,006, 0,004 dan 0,002 g/mL dan hasil lisis *clot* darah adalah 72,6, 64,2, 62,9, 59,2, 56,7%. Hasil ini mirip dengan Streptokinase komersial, diamati bahwa 2000 U/mL Streptokinase komersial memiliki aktivitas yang sama dengan rekombinan Strteptokinase berkonsentrasi 1904 U/mL.
5. Mahmoudi, *et al.*, 2012 melakukan produksi rekombinan streptokinase dengan mikroorganisme awal *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, grup C (ATCC 12388). Adapun komponen produksi rekombinan Streptokinase adalah vektor ekspresi pET32a, sel inang *E. coli* BL21 (DE3), dan media kultur kombinasi ekstrak jamur, tripton, glukosa, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, agar nutrient, MgSO₄, total 25mL. Selanjutnya pemurnian dilakukan dengan kolom Ni-NTA, kualitas dan kuantitas rekombinan Streptokinase dianalisis dengan SDS-PAGE 15% dan Metode Bradford. Dalam media 2.4% glukosa terdapat Streptokinase rekombinan 800 μ g/mL.
 6. 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 ampicilin. 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 rekombinan Streptokinase 47 kDa dan 44 kDa. Ini menunjukkan adanya kemungkinan produksi Streptokinase dari bakteri yang berasal dari manusia.
 7. 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 ampicilin. Sel inang yang digunakan *Escherichia coli* BL21 (DE3) dengan media kultur LB agar dan kaldu. Pemurnian dilakukan dengan kolom Ni-NTA, kualitas dan kuantitas dianalisis dengan SDS-PAGE 15% dan Metode Bradford. Hasil yang didapatkan merupakan rekombinan streptokinase

- dengan massa molekul 65kDa dan konsentrasi Streptokinase 3.2 mg/L. Kondisi terbaik ekspresi dicapai ketika OD 600 nm bernilai 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 dan dapat dijadikan untuk diagnosis serologis infeksi *S. pyogenes*.
8. 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, kloning gen streptokinase dan transkripsi dilakukan *in vitro* dengan vektor ekspresi pPROEX HT yang resisten terhadap ampicilin, dan sel inang ragi *Pichia pastoris* SMD1168, serta media kultur *Yeast Peptone Dextrose* (YPD). Pemurnian dan kuantifikasi Streptokinase rekombinan dilakukan dengan kolom afinitas pengkelat logam, kromatografi filtrasi gel, dan metode Bradford. Uji aktivitas Streptokinase rekombinan juga dilakukan dengan pembandingan Streptokinase komersial (dari Sigma, St. Louis, US). Pada hasil didapatkan kuantitas rekombinan Streptokinase 0,267 µg/ ml dan massa molekul 46kDa. Rekombinan Streptokinase yang didapatkan menunjukkan lisis bekuan (82%) dibandingkan dengan Streptokinase yang tersedia secara komersial (81%) pada konsentrasi enzim 2000 U/mL.
9. Bera, *et al.*, 2015 telah melakukan produksi rekombinan streptokinase dengan menggunakan plasmid pSK99, di mana plasmid tersebut mengandung gen Streptokinase. Vektor ekspresi yang digunakan adalah pAMJ399 dengan promotor P170. Dalam sistem P170, kekuatan induksi berhubungan dengan konsentrasi laktat yang diberikan. Media kultur yang digunakan adalah M17 dengan pH kultur rendah. Sel inang yang digunakan adalah *Lactococcus lactis* MG1363. Identifikasi Streptokinase rekombinan dilakukan dengan SDS PAGE menunjukkan massa molekular 47 kDa.
10. Tran, *et al.*, 2017 melakukan produksi rekombinan Streptokinase dari gen sintetik yang mengkode protein streptokinase rekombinan 48kDa (ID GenBank: ADV18975.1). Penelitian dilakukan dengan menggunakan sistem bebas sel (CFPS) dengan bantuan bioreaktor mini yang ditujukan untuk produksi protein. Vektor ekspresi yang digunakan adalah pT7CFE-Chis, vektor khusus untuk ekspresi mamalia bebas sel, promotor T7, dan resisten ampicilin. Media kultur LB kaldu. Pemurnian dilakukan dengan Kolom Ni-NTA dan SDS PAGE. Didapat hasil massa molekul Streptokinase rekombinan sebesar 52 kDa.
- Dari hasil penelusuran, produksi rekombinan Streptokinase paling umum dilakukan dari *Streptococcus sp.* Vektor dan media kultur yang digunakan pun beragam,

serta sel inang yang paling umum digunakan adalah *Escherichia coli*.

Elektroforesis merupakan salah satu identifikasi yang paling umum dilakukan, dengan gel agarosa maupun SDS PAGE. Elektroforesis merupakan teknik untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya.

Saat ini telah dikembangkan produksi Streptokinase rekombinan dari gen sintetis yang telah berisi gen pengkode Streptokinase dengan sistem produksi bebas sel, di mana hal ini akan meningkatkan keefektifan produksi Streptokinase guna memenuhi kebutuhan pasar.

KESIMPULAN

Teknologi DNA Rekombinan dapat digunakan untuk produksi Streptokinase dengan asal mikroorganisme *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equisimilis*, serta plasmid dan gen sintetis yang mengkode protein Streptokinase. Streptokinase rekombinan yang didapatkan beragam, dengan rata-rata massa molekular 47 kDa. Uji aktivitas Streptokinase rekombinan juga dilakukan pada beberapa penelitian, dimana rekombinan Streptokinase yang didapatkan (yang berasal dari *Streptococcus pyogenes*) menunjukkan lisis bekuan (82%) dibandingkan dengan Streptokinase yang tersedia secara komersial (81%) pada konsentrasi enzim 2000 U/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada ibu Dr. Tina Rostinawati, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingannya dalam

menyelesaikan penulisan *review* artikel ini. Serta kepada Bapak Rizky Abdullah, PhD., Apt. selaku dosen mata kuliah Metodologi Riset dan Biostatistik yang telah memberikan arahan dalam proses penulisan *review* artikel.

PUSTAKA

- Ali, M. R., Hossain, M. S., Islam, M. A., Arman, S. I., dan Raju, G. S., 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.
- 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.
- Khan, S., Ullah, M., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., dan Hou, H. 2016. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life. *Int J Genomics*.
- 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.
- Sikri, N., dan Bardia, A. 2007. A History of Streptokinase Use in Acute Myocardial Infarction. *Tex Heart Inst J*.
- 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.