

Karakterisasi Protein Lendir Bekicot (*Achasin*) Isolat Lokal sebagai Faktor Antibakteri

Protein Characterization of Snail Mucin (*Achasin*) Local Isolate as an Antibacterial Factor

Titiek Berniyanti¹ dan Suwarno²

¹Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Masyarakat, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga; Perum ITS Blok J-8 Keputih Sukolilo Surabaya, 60111
(031) 5931129, Fax: (031)5994418;

²Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
Email : snow_arno@yahoo.co.id

Abstract

This aim of the research is to study the effects of glycoprotein (*Achacin*) Javanis snail mucus *Achatina fulica* Ferussac on the viability of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* bacteria. The existence of some antibacterial factors are likely present in the glycoprotein, and two-step of studies were conducted to investigate it. The first step of study was to identify the antibacterial factor of the snail mucus. The snail used in this study was belong to *Achatina fulica* Ferussac species, and captured in East Jawa. The antibacterial activity was identified in the aqueous extract and mucin fraction of the mucus Javanis snail on that two kinds of tested bacteria. The second step in this study was to characterize and to detect the molecular *Achacin*. An antibacterial activity was found in the mucin obtained from the body surface mucus *Achatina fulica* Ferussac of Local Isolate. The mucin fraction exhibited positive antibacterial activity both for the Gram positif bacteria, *Streptococcus mutans* and Gram negative bacteria, *Escherichia coli*. Antibacterial factor from body surface of the Local isolate, *Achatina fulica* Ferussac, was isolate by DEAE (Sephadex) ion exchange chromatography. The antibacterial factor namely *achasin* was purified and have molecular weight of 71,3 kDa.

Key words: Mucus *achatina fulica*, *achasin*, antibacterial factor

Pendahuluan

Protein *Achasin* lendir bekicot merupakan protein yang mempunyai fungsi biologik penting, selain dimaksudkan untuk mencegah terjadinya penguapan, membantu pergerakan secara halus, juga diperlukan untuk melindungi tubuh dari luka-luka mekanis (Simkiss dan Wilbur, 1977). Oleh karena itu walaupun tubuhnya sangat fragil dan kondisi jaringan kulitnya sangat basah, binatang ini mempunyai resistensi terhadap mikroorganisme. Keberadaan faktor antibakteri tampaknya ada dalam lendir tersebut.

Faktor antibakteri *Achasin* ini menurut (Otsuka, 1991) dapat bekerja dengan cara menyerang atau menghambat pembentukan bagian-bagian yang umum dari strain bakteri seperti, lapisan peptidoglikan dan membran sitoplasma. Lapisan peptidoglikan (Jawetz, 2001) adalah komponen pembentuk dinding sel, dimana pada bakteri dinding sel ini diperlukan cukup kuat untuk menahan tekanan osmotik dari luar.

Studi gen dan hambatan mengatakan bahwa terdapat dua cara sintesa peptidoglikan dalam pertumbuhan sel, yaitu elongasi dan septasi (Wang, 1998). Elongasi dan septasi dikatakan membutuhkan *Penicilin Binding Protein* (PBPs), yaitu suatu transpeptidase yang berperan dalam katalisator fase akhir dari biosintesa peptidoglikan. Aktivitas antibakteri ini juga mengakibatkan terjadinya pemanjangan (*elongation*) pada tubuh *Escherichia coli* tiga sampai tujuh kali dibandingkan dengan ukuran normal, serta mencegah terbentuknya septum pemisah.

Akibat yang terjadi walaupun banyak nukleus yang dihasilkan pada proses replikasi sel, sel akan tetap gagal untuk memisah karena septum tidak terbentuk (Otsuka-Fuchino, 1993; Dewar dan Dorazi, 2000). Sasaran *achasin* pada *Staphylococcus aureus*, adalah membran sitoplasmanya, yaitu dengan cara menyerang membran sitoplasma dan mengakibatkan dinding sel terkelupas dan tenggelam ke dalam sitoplasma.

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk memecahkan masalah kelangkaan obat dengan bahan baku lokal di Indonesia. Isolasi dan karakterisasi protein sebagai peptida antimikroba yang mempunyai kemampuan antibakteri yang cukup tinggi, terutama ikatannya terhadap protein membran bakteri akan merupakan dasar penting dari penelitian ini. Protein ini juga mempunyai derajat kemurnian yang cukup tinggi dan lebih aktif. Sehingga dengan melakukan isolasi dan purifikasi protein achasin lendir bekicot *Achatina Fullica* Ferrusac isolat lokal akan didapatkan bahan dasar yang dapat mematikan pertumbuhan bakteri *S. mutans*. *S. mutans*, merupakan *cariogenic plaque organism*, yaitu suatu organisme yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan suatu zat dengan berat molekul yang tinggi yaitu *extracellular glucan* yang dapat melekat pada permukaan enamel dan sangat berperan pada proses pembentukan plak gigi. Pembentukan *dental plaque* merupakan syarat utama untuk memulai proses patogenesis yang menghasilkan karies gigi (Kusuma, 1990; Hashizum, *et al.*, 2002). Dengan demikian protein achasin lendir bekicot isolat lokal dapat digunakan sebagai komponen terapi khususnya pada infeksi karies gigi.

Protein Achasin pada bekicot *Achatina Fullica* Ferrusac mempunyai fungsi biologik penting, antara lain sebagai reseptor pengikat protein (enzim) bakteri. Pada saat terjadi infeksi, bakteri akan tumbuh, melakukan duplikasi dan kemudian membelah diri dengan cara membentuk septum dan memisah menjadi sel anak. Protein achasin akan mengikat protein (enzim) yang ada dan mengganggu aktifitas enzim tersebut untuk membentuk septum sehingga bakteri dicegah untuk memisah. Ikatan antara protein achasin dan protein enzim pada membran bakteri dapat dijadikan dasar pembuatan bahan baku untuk terapi pada infeksi karies gigi. Protein dikatakan juga mempunyai derajat kemurnian yang cukup tinggi. Permasalahannya adalah apakah protein achasin lendir bekicot *Achatina fullica* ferrusac isolat lokal akan mempunyai daya antibakteri yang sama, untuk itu perlu dilakukan isolasi dan karakterisasi terhadap protein achasin tersebut sehingga nantinya dapat dibakukan sebagai komponen kit terapi yang bermanfaat untuk pengobatan.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan suatu alternatif obat yang relatif ekonomis dan berdaya kerja luas serta aman dalam upaya pengembangan obat dibidang kedokteran gigi dengan melakukan isolasi dan karakterisasi protein achasin lendir bekicot isolat local sebagai antibakteri.

Pengembangan obat baru diharapkan bermanfaat bagi peningkatan derajat kesehatan masyarakat, sekaligus berimplikasi pada bidang ekonomi dan pemberdayaan masyarakat

Metode Penelitian

Isolasi lendir bekicot

Sampel didapat dari lendir bekicot *Achatina fulica* ferussac lokal, sebanyak 10-50 bekicot, dengan elektrik shok dari aliran listrik 5-10 volt, selama 30-60 detik. Lendir dimaserasi dengan air selama 24 jam didalam suhu 4°C. Fraksi lendir yang larut dalam air (*Water soluble fraction*) didapat dari prosedur mencampur air sebanyak dua kali jumlah sampel yang ditambahkan pada lendir tersebut. Supernatan yang didapat dikatakan sebagai WSF.

Fraksi lendir (*Mucin Fraction*) dari WSF didapatkan dengan menggunakan etanol presipitasi yaitu mencampur supernatan hasil maserasi dengan air dengan dengan etanol absolut dengan perbandingan 1:3, yang merupakan metode isolasi umum dari lendir. WSF dan campuran tersebut disentrifuse pada 2900 g selama 30 menit. Presipitasi yang didapat dilarutkan kembali dengan Tris-Cl dan didapatkan fraksi mucin.

Uji aktivitas lendir bekicot *Achatina fulica* Ferrusac isolat lokal

Pengujian aktivitas dimaksudkan untuk mendapatkan isolat aktif murni dengan aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri diuji pada tahap lendir hasil isolasi. Metode yang dipakai selain metode difusi agar nutrient juga digunakan pengujian dengan metode paperdish steril. Semua uji dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow*.

Spesies bakteri gram positif *Streptococcus mutans* dan Spesies bakteri gram negatif *Escherichia coli* di benihkan dalam medium Lowry Berthani (LB) cair yang mengandung tryptone 1%, yeast extrac 0,5 %, dan NaCl 1%. Diperiksa dengan menggunakan metode sumuran (*paper dish*). Bakteri *S. mutans* dan *E. coli* sebanyak 5 ml di benihkan pada medium *liquid bouillon* (pH 7.0) 30°C selama 24 jam. Bakteri yang tersuspensi inilah yang digunakan sebagai stok kultur bakteri uji. Sebanyak 100 ml diusapkan pada medium agar padat yang dibuat dengan ketebalan 3 cm, dan 15 lubang dibuat pada medium padat tersebut. Lubang diisi dengan lendir bekicot hasil isolasi. Sesudah inkubasi selama semalam pada suhu 37°C, *growth inhibitory circle* ditemukan disekitar sampel yang dilubangi untuk sampel yang positif, sementara tidak ada margin yang jelas pada sampel yang negatif. Aktivitas ditunjukkan dengan mengukur lebar *growth-inhibitory* dengan margin jelas di sekitar lubang

Pemurnian protein dengan kromatografi penukar ion

Hasil presipitasi (fraksi Etp) yang didapat dan telah dipekatkan dilarutkan dengan buffer Tris-HCl, untuk kemudian dilakukan pemurnian dengan

kromatografi penukar ion. Kromatografi penukar ion dilakukan dengan menggunakan penukar anion matriks sepharose dalam buffer tris 50 mM dengan pH 8, serta kolom dengan panjang 17 cm dan berdiameter 4 cm. Sepharose dipersiapkan dulu sebelum dipacking dalam kolom. Kolom dipacking dengan matriks sepharose sampai padat dan sesuai dengan ketinggian yang diinginkan. Kalibrasi dengan buffer Tris-HCl 50 mM dan pH 8 dilakukan sepanjang 2 kali kolom. Selanjutnya sampel sebanyak 3,5 ml dimasukkan ke dalam kolom dan dilakukan elusi dengan buffer nol sebanyak 120 ml untuk melepaskan bahan-bahan yang tidak terikat pada matriks lebih dulu. Selanjutnya kolom dielusi dengan gradien 0.1-0.8 M NaCl dalam 200 ml buffer tris 50 mM pH 8. Glikoprotein yang telah dipisahkan dalam fraksi-fraksi berdasarkan muatan ionnya kemudian dispektrofotometri dengan OD 280 UV dan untuk selanjutnya dilakukan uji aktivitas.

Pemurnian dan karakterisasi protein dengan SDS-PAGE

Protein dengan aktivitas positif hasil kromatografi penukar ion selanjutnya dikumpulkan dan disimpan untuk selanjutnya dilakukan purifikasi dan karakterisasi dengan *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk mendapatkan pita dominan dengan berat molekul tertentu.

Karakterisasi dilakukan dengan teknik SDS-PAGE (Wayan, 1991) dengan komposisi *separating gel* 10 % (1,2 g acrylamid ; 0,032 g bis- acrylamid ; 3 ml 1,5 M Tris ph 8,8 ; 0,12 ml SDS 10 % ; 8,88 aquades, 7 µl TEMED dan 80 µl APS 10%) dan *stacking gel* 3 % (0,9 g acrylamid ; 0,024 g bis- acrylamid ; 2,52 ml 1,5 M Tris ph 6,8 ; 0,3 ml SDS 10 % ; 17,18 aquades, 3,5 µl TEMED dan 50 µl APS 10%).

Larutan *separating gel* 10 % dimasukkan pada *gel plate* pada posisi vertikal, kemudian diatasnya ditambahkan butanol dan dibiarkan polimerisasi. Proses selanjutnya adalah penambahan *stacking gel* 3% dimasukkan ke kaca sampai penuh kemudian pasang sisir dan ditunggu sampai polimerisasi. Plat berisi gel kemudian dipasang pada *Minigel Twin G-42 slab* dan dituangi *electrophoresis buffer* (3g 0,0248 M Tris; 14,4 g 0,19 M glisin ; 10 ml 0,1% SDS 10 %) ditempat yang akan dialiri elektroda. Sebanyak 50 µl sampel achasin yang sudah disiapkan diletakkan dalam endop, kemudian ditambah 5 x SDS sampel - buffer (red Prob-b) sebanyak 12,5 µl (2,5 ml 1,5 M Tris pH 6,8 ; 2 g SDS ; 0,5 g Dithiothretol (DTT)/ 5 ml merchaptoethanol) ; 10 mg bromphenol blue ; 10 ml gliserin dan 2,5 ml aquades). Sampel kemudian direbus selama 2 menit diangkat dan langsung dimasukkan es, dituang sedikit demi sedikit ke dalam masing-masing sumuran *stacking gel*. Sebagai marker digunakan protein dengan berat molekul pada

kisaran 6,5-205 kDa produksi Sigma. *Power supply* dinyalakan arus listrik yang dipakai 99,9 volt, 50 mA dan 12 W. Jika sampel sudah bereaksi sampai bawah, maka koleksi protein dihentikan. *Plate* dibuka dan dipisahkan, selanjutnya dicuci dengan *buffer* dan dicat dengan *methylen blue*.

Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini adalah penelitian observasional eksploratif. Observasional eksploratif karena penelitian ini bertujuan untuk melakukan pengamatan-pengamatan untuk memperoleh suatu data berupa isolat aktif yang murni dan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* dan *E. coli*. Sampel yang telah diisolasi dari bekicot *Achatina fulica* ferussac galur jawa dilakukan uji antibakteri terlebih dahulu dengan uji difusi agar (sumuran/paper dish steril) terhadap Bakteri *E. coli* dan *S. mutans*. Hasil yang diperoleh berupa zona hambatan yang tampak disekitar bakteri uji yang digunakan.

Perhitungan statistik digunakan untuk melakukan pengukuran terhadap fraksi dengan puncak dominan dengan menggunakan spektrofotometer, serta karakterisasi glikoprotein (Ahasin) untuk mendapatkan isolat aktif dari lendir bekicot galur Jawa yang murni dengan berat molekul tertentu. Pada perhitungan berat molekul digunakan analisis regresi linier untuk menentukan dan menghitung berat molekul.

Isolasi lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac isolat lokal

Lendir dari bekicot *Achatina fulica* ferussac atau achasin yang dikoleksi dengan *electric shock* pada tegangan listrik 5-10 volt, selama 30-60 detik sangat kental, volume rata-rata yang dihasilkan sebesar 1,5 - 4 ml tiap ekor dan kekentalannya berbeda pada tiap-tiap pengumpulan. Warna lendir sedikit keruh dan berwarna pucat/putih sampai kuning atau kecoklatan. Pada kondisi tertentu walaupun telah dirangsang dengan *electric shock* bekicot tidak mau mengeluarkan lendirnya.

Aktivitas antibakteri lendir bekicot *Achatina Fullica* Ferussac isolat lokal

Pengujian aktivitas terhadap lendir hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan metode difusi. Satu spesies bakteri gram negatif *S. mutans* isolat gigi dan satu spesies gram positif bakteri *E. coli* (DH₅α) dibe-nihkan dalam medium *liquid bouillon* dengan kondisi pH medium 7,0 dan suhu medium 37°C. Pembenuhan ini dilakukan selama 24 jam. Inokulum sebanyak 100 µl ditetaskan dan diusap pada agar padat dalam kon-disi tetap bebas kuman lain. Masing-masing sumuran maupun *paper dish* diisi dengan 50 µl achasin tanpa

mempertimbangkan kadar yang dikandungnya dan disimpan pada suhu 37°C dan diobservasi selama 24 jam (Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Hasil uji lendir (bahan mentah) pada *Streptococcus mutans* dengan metode difusi agar nutrien. (↗) = Zona sensitivitas hasil uji aktifitas

Gambar 1 adalah hasil pengujian aktivitas dari lendir terhadap bakteri *S. mutans*. Gambar 2 adalah hasil pengujian aktivitas dari lendir terhadap bakteri *E. coli* dan menunjukkan hambatan yang cukup besar pula.



Gambar 2. Hasil uji aktivitas lendir (bahan mentah) pada *E. coli* dengan metode difusi agar nutrien. (↗) = Zona sensitivitas hasil uji aktifitas

Uji difusi agar nutrien yang dilakukan pada lendir setelah diisolasi menunjukkan adanya zona sensitivitas yang berukuran 12,5 mm pada uji dengan bakteri *E. coli* dan 15 mm pada uji dengan *S. mutans*. Zona yang tampak sebagai hasil uji difusi agar

(sumuran/*paper dish*) menunjukkan adanya hambatan pada pertumbuhan bakteri baik *Streptococcus mutans* maupun *Echerichia Coli*. Hasil ini menunjukkan adanya faktor antibakteri yang terkandung pada lendir bekicot *Achatina Fullica* Ferussac isolat lokal.

Fraksinasi achasin dengan kromatografi penukar ion /kromatografi kolom DEAE Sepharose (Anion Exchanger)

Hasil presipitasi etanol (fraksi Etp) merupakan endapan yang tampak padat dan kental tapi mencair ketika diresuspensi. Hasil Fraksi Etp yang telah diresuspensi dalam 50 mM Tris-HCL pH 8 selanjutnya dilakukan *freeze dry*, dimana hasil *freeze dry* merupakan protein yang pekat dan kering. Fraksi Etp yang cukup encer dan tidak berlendir selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom kromatografi penukar ion tujuannya untuk memisahkan protein tersebut yang didasarkan pada prinsip daya tarik elektrostatis dari molekul yang bermuatan dengan suatu matriks padat yang mengandung grup lawan yang bermuatan dan berikatan secara kovalen.

Protein yang berwarna putih bening yang mengisi *fraction collector* berjumlah ± 120 tabung, yang terpisah berdasarkan muatan ionnya. Protein yang dihasilkan terpisah dalam fraksi-fraksi berdasarkan muatan ionnya tersebut, sebagaimana disajikan pada Gambar 3.

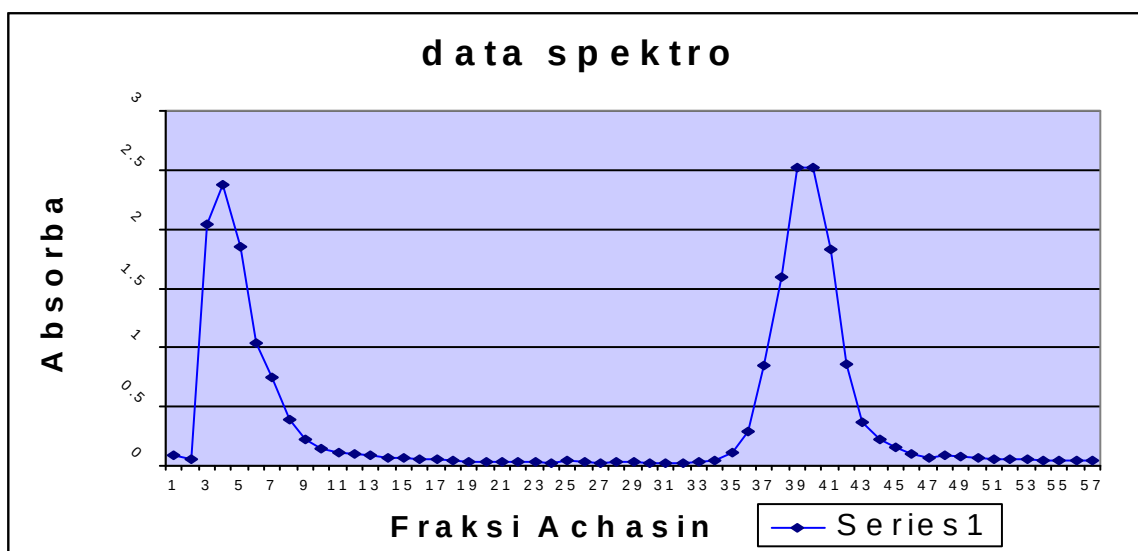
Hasil dari pemurnian dengan kromatografi penukar ion menunjukkan tidak semua fraksi mempunyai aktivitas, hanya beberapa fraksi saja. Fraksi-fraksi dengan aktifitas kemudian dikumpulkan dan dimurnikan kembali dengan SDS-PAGE, selanjutnya pita hasil SDS-PAGE diukur berat molekulnya.

Dialisis dilakukan dengan maksud menghilangkan garam-garam yang masih ada setelah proses kromatografi. Dialisis menggunakan bufer Tris-Cl 10 mM lebih rendah konsentrasinya daripada bufer Tris-Cl yang digunakan pada kromatografi dengan harapan garam yang ada akan mengalir keluar bufer yang lebih rendah. Hasil yang didapat adalah cairan bening dengan volume yang sedikit bertambah, yang selanjutnya disimpan dalam *freezer* untuk uji lebih lanjut.

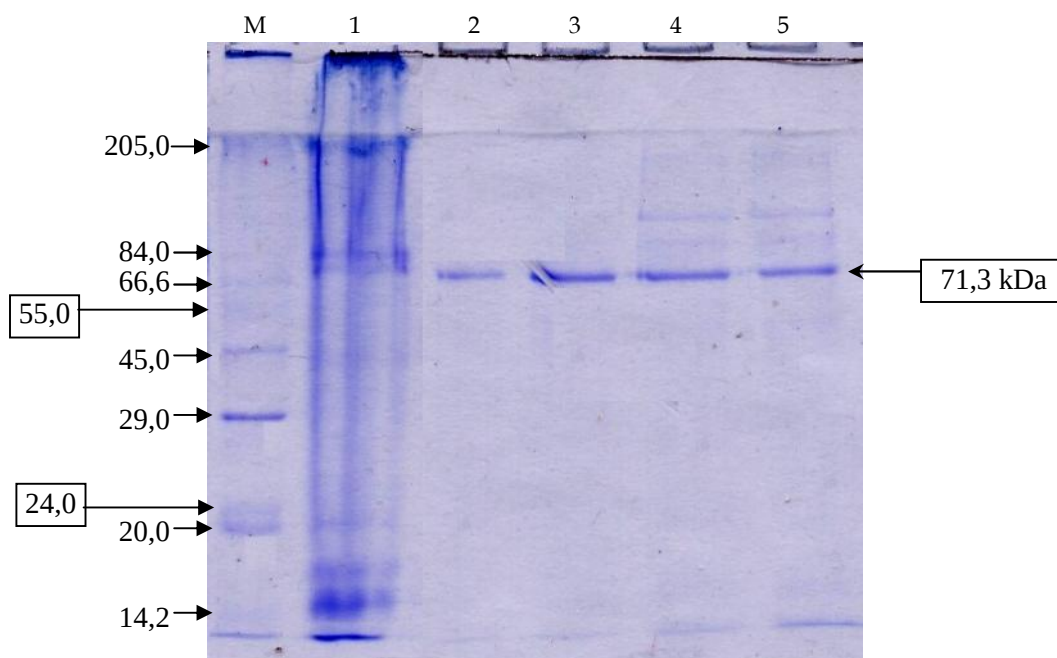
Purifikasi dan karakterisasi protein berdasarkan berat molekulnya

Setelah didapati protein dengan aktivitas dari hasil pemurnian dengan kromatografi penukar ion, kemudian protein dengan fraksi-fraksi yang mempunyai aktivitas dikumpulkan dan dimurnikan lagi dengan SDS-PAGE.

Hasil elektroforesis dengan SDS-PAGE yang menggunakan pengecatan dengan *commasie brilliant blue* menunjukkan adanya satu band yang dominan dengan berat molekul 71,3 kDa.



Gambar 3. Hasil fraksinasi achasin dengan kromatografi penukar ion digambarkan dalam grafik dengan puncak-puncak tertentu yang diukur dengan spektrofotometer λ 280 nm dan terpisah dalam fraksi-fraksi berdasarkan muatan ionnya.



Gambar 4. Profil protein murni hasil kromatografi penukar ion dengan berat molekul tertentu. M, marker; kolom 1, kontrol; kolom 2-5, perlakuan.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan: Achasin yang diisolasi dari Lendir bekicot *Achatina fulica* Ferussac galur Jawa merupakan molekul protein dengan berat molekul 71,3 kDa yang aktif sebagai antibakterial dengan kondisi reaksi pada pH larutan: 7,98-8,0.

Ucapan Terima Kasih

Artikel ini merupakan bagian dari hasil penelitian Dosen Muda yang dibiayai oleh bagian proyek pengembangan sumber daya manusia Dirjen Dikti. Perkenankan kami menyampaikan terima kasih kepada bagian proyek pengembangan sumber daya manusia Dirjen Dikti, Lembaga Penelitian Universitas

Airlangga dan semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Bachrudin. 1992. Isolasi, Identifikasi dan Pemurnian Protein. PAU Bioteknologi UGM. Yogyakarta.
- Dewar SJ, and Dorazi R. 2000. Control of division gene expression in *Escherichia coli*. J FEMS Microbiol Lett. 187(1): 1-7.
- Guzman LM, Weiss D, and Beckwith J. 1997. Domain swapping analysis of FtsI, FtsL, and FtsQ, bitopic membrane protein essential for cell division in *Escherichia coli*, J of Bacteriology. 179: 5049-5103.
- Hashizum LN, Shinada K, Kawaguchi Y, and Yamashita Y. 2002. Sequence of ultrastructural changes of enamel crystals and *Streptococcus mutans* biofilm in early enamel caries *in vitro*. J Med Dent Sci, 49: 67-75.
- Iguchi SMM, Aikawa T, and Matsumoto JJ. 1982. Antibacterial activity of snail mucus mucin. Printed in Great Britain Journal Comp. Bio. Chem. Physiol. 72A(3): 571.
- Ion Exchange Chromatography. 2000. Mitosis Ca duceus MCAT Review Available from <<http://www.scientia.org/canduceus/card/biology/mitosis.html>> 8/23/00 4:01 PM.
- Jawetz, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks JF, Butel JS, and Nicholas OL. 2001. Medical Mikrobiologi, 12th Ed. Apleton and Large. Prentice-Hall International Snc. London. UK.
- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, and Wilfert CM. 1992. Zinsser Microbiology. 20th ed. Appleton & Lange. Norwalk. Connecticut. San Mateo. California.
- Kubota Y, Watanabe Y, Otsuka H, Tamiya T, Tsuchiya T, and Matsumoto JJ. 1985. Purification And characterization of an antibacterial factor from snail mucus. J. Comp. Physiol. Biochem. 82C(2): 345-348.
- Kompiang dan Creswell dalam Wijayanti. 1989. Pedayagunaan Bekicot. Konggres Nasional Biologi IV. Bandung.
- Lohner K, and Staudegger E. 2001. Development of Novel Antimicrobial Agent. Emerging Strategies. Horizon Scientific Press. Wymondham. nited Kingdom.
- Otsuka-Fuchino. 1992. Bactericidal action of gliko-protein from snail body surface mucus of giant african snail. J. Comp. Biochem. Physiol. 101C: 607-6013.
- Otsuka-Fuchino. 1993. Morphological aspect of achacin treated bacteria. J. Comp. Biochem. Physiol. 104C: 37-41.
- Pogliang J, Pogliang K, Weiss DS, Losick R, and Eckwith J. 1997. Inactivation of FtsI inhibit constriction of the FtsZ cytotkinetic ring and delays the assembly of FtsZ ring at potensial division sites. Proc.cNational Academy of Sciences of The USA. Geneticsc 94: 559-564.
- Purwoko E. 1987. Isolasi dan identifikasi bakteri pada bekicot (*Achatina fulica*) yang patogen terhadap ikan. FKH IPB. Bogor.
- Rantam FA. 1998. Culturing dengue virus from DHF patients in Surabaya. Laporan Penelitian, TDC Unair.
- Wang L, Medhat K, Khattar, Donaachie WD, and Lutkenhaus J. 1998. FtsI and FtsW are localized to septum in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 180: 2810-2816.
- Weiss DS, Chen JC, Ghigo JM, Boyd D, and Beckwith J. 1999. Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor. The Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL, Journal of Bacteriology. 181(2): 508-520.
- Wongso S. 1990. Elektroforesis Gel Protein. PAU-Bioteknologi Universitas Gajahmada Jogjakarta.
- Wayan TA. 1991. Rekayasa Genetika. Pusat Antar Universitas-Bioteknologi Universitas Gajahmada, Jogjakarta.
- Zhao G, Yeh WK, Carnahan RH, Flokowitsch J, Meyer TI, Wiliam E, Alborn JR, Gerald W, Becker, and Jaskunas R. 1997. Biochemical characterization of penicillin-resistant and-sensitive penicillin-binding protein 2x transpeptidase activities of *Streptococcus pneumoniae* and mechanistic implications in bacterial resistance to β -lactam antibiotic. Journal of Bacteriology. Aug. 4901-4908.