

PRODUKSI, ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM DEKSTRANASE dari *Arthrobacter sp. B7*

Afaf Baktir*, Untung Murdiyato**

* Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Airlangga

** Staf Ahli Direksi PTP Nusantara XI

ABSTRACT

Dextranase enzyme has been purified and characterized from Arthrobacter sp. B7. This enzyme was purified from the culture supernatant of Arthrobacter sp. B7 by procedure of native PAGE. The molecular size of the enzyme was estimated 72,5 kDa by SDS-PAGE. The N-terminal amino acid sequence of this enzyme determined using Edman degradation techniques were APVTADVGNLHT. SDS-PAGE and native-PAGE analysis revealed that the enzyme molecule consisted of one sub-unit.

Key words: *Arthrobacter sp. strain B7, dextranase, production, isolation, characterization*

PENGANTAR

Enzim dekstranase B7DEX adalah sebutan bagi enzim yang dihasilkan oleh *Arthrobacter sp. B7* (Baktir dan Murdiyato, 2003). Enzim ini dapat menghidrolisis ikatan α -1,6 pada glukosa, digunakan untuk mengatasi permasalahan yang ditimbulkan oleh dekstran selama proses produksi gula tebu (Murdiyato dkk., 1994).

Enzim B7DEX adalah sebuah enzim baru yang berasal dari isolat baru, yaitu *Arthrobacter sp. B7*. Bagi gen baru belum tersedia informasi yang dapat dijadikan dasar atau alat bantu untuk melakukan kloning gen. Dalam penelitian ini dilakukan produksi, pemurnian serta penentuan BM, urutan asam amino ujung-N dan jumlah sub-unit penyusun molekul B7DEX, sebagai data yang diperlukan untuk membantu percobaan kloning gen B7DEX pada penelitian selanjutnya.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Sampel penelitian adalah enzim dekstranase B7DEX, yang diproduksi dari *Arthrobacter sp. B7*. Bahan kimia yang digunakan meliputi akrilamid, bisakrilamid, TEMED, SDS, marker berat molekul protein, komasi biru, dan dekstran biru 2000^R yang merupakan produk Sigma.

Cara Kerja

Kultivasi *Arthrobacter sp. B7*

Medium padat untuk kultivasi B7 mengandung ekstrak ragi 0,5%, dekstran 1%, KH_2PO_4 0,1%, NaCl 0,1%,

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,24%, CaCl_2 0,01%, dan agar 1,5%. Medium pertumbuhan cair dan medium produksi dekstranase terdiri atas bahan dan komposisi yang sama dengan medium pertumbuhan padat, kecuali tanpa penambahan agar dan dekstran biru.

Stok biakan *Arthrobacter sp. B7* yang diperoleh dari Laboratorium Bioteknologi P3GI Pasuruan dipindahkan menggunakan ose ke medium padat dalam cawan petri. Biakan diinkubasi pada 32–33°C selama 1–2 hari. Diambil koloni tunggal yang di sekitarnya menunjukkan daerah tidak berwarna, dan dipindah ke media pertumbuhan cair 5 ml dalam tabung reaksi bertutup (12 ml), kemudian diinkubasi pada 32–33°C dengan penggojokan pada 145 rpm selama 20 jam, sehingga diperoleh inokulum *Arthrobacter sp. B7*.

Perbanyak sel *Arthrobacter sp. B7* dilakukan sebagai berikut. Disiapkan 50 ml medium pertumbuhan cair yang steril dalam Erlenmeyer 200 ml, diinokulasi dengan 0,5 ml inokulum *Arthrobacter sp. B7*, kemudian diinkubasi pada 32–33°C dengan penggojokan pada 145 rpm selama 20–24 jam, sehingga diperoleh biakan cair.

Produksi enzim B7DEX

Produksi enzim B7DEX dilakukan dalam medium produksi cair. Biakan cair yang didapat disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm pada 4°C selama 15 menit, supernatan dipisahkan, kemudian dipekatkan menggunakan freeze dryer sampai volumenya menjadi 1/10 kali volume semula, kemudian dilakukan dialisis menggunakan bufer sitrat 0,05 M pH 5 sehingga diperoleh ekstrak enzim B7DEX.

Isolasi enzim B7DEX

B7DEX diisolasi dari ekstraknya dengan cara melakukan elektroforesis gel poliakrilamid B7DEX kondisi alami (*Native-PAGE*) menurut metode Bollag *et al.* (1996) yang dimodifikasi. Pita-pita protein yang tampak pada gel poliakrilamid 12% dikelompokkan menjadi 4 fraksi, dan dilakukan uji aktivitas dekstranase setiap fraksi setelah protein dilepas dari gel dengan metode elektroelusi. Hal ini dilakukan untuk mengetahui posisi pita dengan aktivitas dekstranase. Selanjutnya dilakukan elektroforesis ekstrak B7DEX secara preparatif, yang menggunakan sebuah sumuran lebar pada gel poliakrilamid 12% mengandung dekstran biru 0,4%, yang diapit dengan sumuran kecil sebagai penanda. Pita dekstranase yang tidak diwarnai dipotong, kemudian protein dekstranase dilepas dari gel dengan cara elektroelusi.

Kemurnian protein dekstranase diuji dengan melakukan elektroforesis dua dimensi (Phillips, 1988). Pemisahan dalam dimensi horizontal dilakukan dengan elektroforesis fokus isoelektrik pada pH 4–7, diikuti dengan pemisahan dalam dimensi vertikal dengan SDS PAGE.

B7DEX murni digunakan untuk estimasi BM, penentuan jumlah sub-unit penyusun molekul dan penentuan urutan asam amino ujung-N protein B7DEX.

Penentuan berat molekul dan jumlah subunit B7DEX

Berat molekul B7DEX diestimasi dengan cara membandingkan mobilitas (R_f) B7DEX murni dan protein marker pada SDS-PAGE (Walker, 1996).

Jumlah subunit penyusun molekul B7DEX ditentukan dengan mengamati jumlah pita yang terbentuk pada elektroforesis B7DEX kondisi alami (*Native-PAGE*) dan kondisi denaturasi (SDS-PAGE). Elektroforesis dilakukan pada gel poliakrilamid 12%.

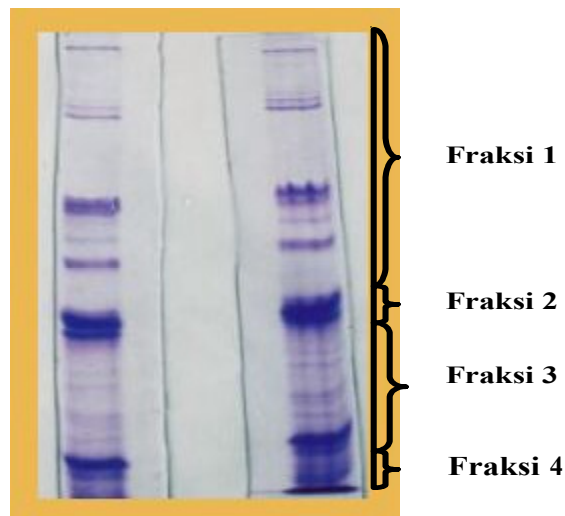
Penentuan urutan asam amino ujung-N B7DEX

Urutan asam amino ujung N ditentukan dengan metode degradasi Dansyl-Edman (Bollag *et al.*, 1996).

HASIL

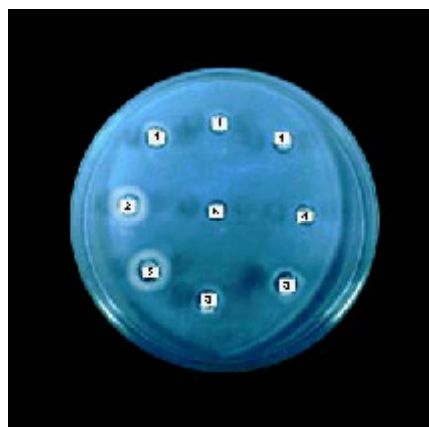
Isolasi Enzim B7DEX

Ekstrak enzim B7DEX, yang merupakan supernatan biakan cair *Arthrobacter sp.* B7 yang telah dipekatkan dan didialisis, memberikan profil elektroforesis seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforegram ekstrak B7DEX pada gel poliakrilamid *native* A dan B berturut-turut menggunakan gel poliakrilamid 8 dan 10% Alat: Mini Protean II Gel Electrophoresis Cell, BioRad.

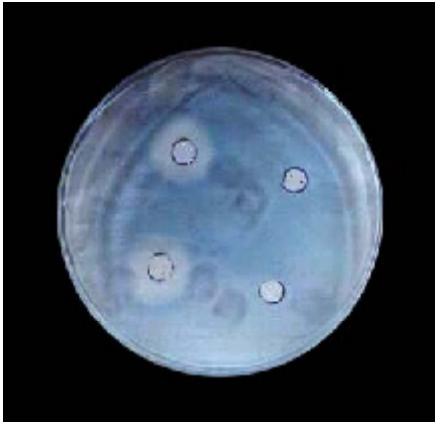
Pita-pita protein pada Gambar 1 dikelompokkan menjadi 4 fraksi, hasil uji aktivitas setiap fraksi secara kualitatif dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil uji aktivitas dekstranase fraksi-fraksi dari ekstrak B7DEX 1,2,3 dan 4 = fraksi 1,2,3 dan 4. K=kontrol (bufer pH 7) Zona *halo* tampak jelas di sumuran-2 pada *plate*- agar mengandung dekstran biru 1%

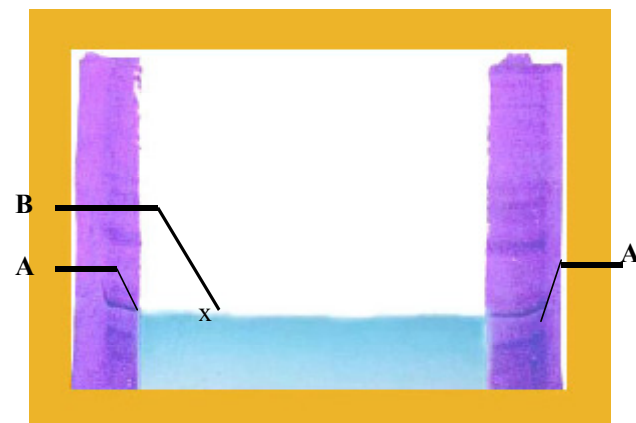
Dari hasil uji aktivitas fraksi-fraksi pada Gambar 2 tampak bahwa fraksi 2 menunjukkan aktivitas dekstranase, yaitu terbentuk daerah *halo* di sekitar sumuran 1, sedang fraksi 1, 3, dan 4 tidak menunjukkan aktivitas dekstranase, walaupun di sekitar sumuran 1 dan 3 tampak daerah *halo* yang sangat kecil, yang terjadi karena kurang sempurnanya pemisahan pita pada gel. Selanjutnya dilakukan elektroforesis untuk memisahkan pita-pita yang terdapat pada fraksi-2,

kemudian setiap pita dipotong dan dilakukan elektroelusi. Terdapat dua pita pada fraksi-2 yang hasil uji aktivitasnya dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil uji aktivitas dekstranase pita pada fraksi 2 K = kontrol (buffer fosfat sitrat pH 7), P1 dan P2 berturut-turut pita 1 dan pita 2. Zona *halo* hanya tampak jelas di sumuran P1 pada *plate* agar yang mengandung dekstran biru 1%

Setelah diketahui posisi pita dekstranase pada elektroforegram ekstrak dekstranase, selanjutnya setelah dilakukan elektroforesis ekstrak B7DEX dalam sumuran besar pada pendukung gel poliakrilamid yang mengandung dekstran biru 0,4%, sehingga diperoleh *zymogram* seperti terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4. *Zymogram* ekstrak B7DEX pada gel poliakrilamid *native* A: pita dekstranase setelah dicat dengan komasi biru, B: pita B7DEX yang tidak dicat (berupa gel tidak berwarna tepat di atas gel biru yang mengandung dekstran biru 0,4%)

Pita dekstranase pada *zymogram* dipisahkan dengan pemotongan gel. B7DEX murni yang diperoleh dari

elektroelusi potongan pita dekstranase ini menunjukkan sebuah noda pada uji kemurnian dengan 2D-PAGE (Gambar 5).



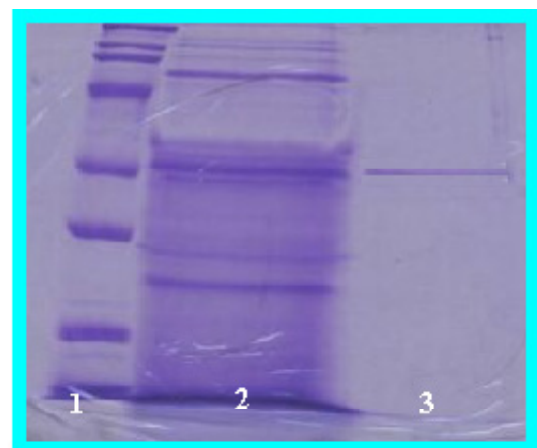
Gambar 5. Elektroforegram B7DEX hasil 2D-PAGE Pemisahan dalam dimensi horizontal dilakukan dengan elektroforesis fokus isoelektrik pada pH 4–7, diikuti dengan pemisahan dalam dimensi vertikal dengan SDS PAGE. Alat: Protean II Gel Electrophoresis Cell, Bio-Rad

Berat Molekul dan Jumlah Sub-unit B7DEX

Pada penentuan BM enzim B7DEX dan jumlah sub-unit penyusunnya diperoleh data elektroforegram B7DEX pada SDS- dan *native*-PAGE berturut-turut pada Gambar 6 dan 7.

kDa

200,0
97,4
66,2
45,0
31,0
21,0

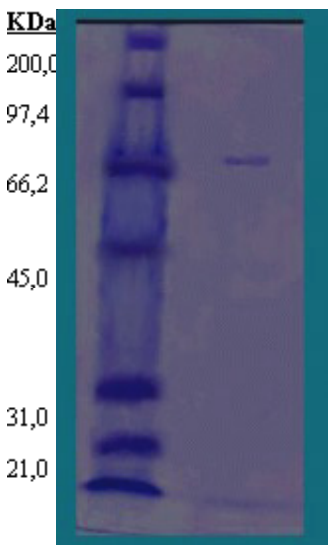


Gambar 6. Elektroforegram B7DEX hasil SDS PAGE. Kadar poliakrilamid pada gel 12%, alat: Protean II Gel Electrophoresis Cell, Bio-Rad. 1 = marker protein, 2 = ekstrak B7DEX, 3 = B7DEX hasil pemurnian

Tabel 1. Korelasi antara mobilitas (Rf) dan berat molekul (BM) protein-protein marker

| Pita ke | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|----------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| Rf | 0,06 | 0,10 | 0,13 | 0,22 | 0,42 | 0,59 | 0,84 | 0,98 |
| BM (kDa) | 200,0 | ? | ? | 97,4 | 66,2 | 45,0 | 31,0 | 21,0 |

Berdasarkan data pada Gambar 6 dibuat korelasi BM (berat molekul) dan Rf (mobilitas) protein-protein marker pada Tabel 1. BM B7DEX diperoleh berdasarkan perbandingan Rf pita B7DEX dan pita marker yang memiliki BM 66,2 KDa. Berdasarkan Rf molekul B7DEX sebesar 0,46 (dari Gambar 6), maka dapat diperoleh estimasi BM B7DEX adalah $0,46/0,42 \times 66,2 \text{ KDa} = 72,5 \text{ KDa}$. Dengan cara yang sama dihitung BM B7DEX berdasarkan data Rf pita B7DEX pada *native*-PAGE (Gambar 7), diperoleh BM yang sama, yaitu sekitar 72,5 KDa.



Gambar 7. Elektroforegram B7DEX hasil *Native* PAGE. Kadar poliakrilamid pada gel *native* 12% Menggunakan alat Bio-Rad Protean II Gel Electrophoresis Cell 1 = marker protein, 2 = B7DEX hasil pemurnian

Urutan Asam Amino Ujung-N B7DEX

Dalam penentuan urutan asam amino ujung-N protein murni B7DEX dengan metode degradasi Dansyl-Edman diperoleh urutan: APVTADVGNLHT.

PEMBAHASAN

Elektroforegram preparat B7DEX murni, baik pada SDS-PAGE (Gambar 6) maupun *native*-PAGE (Gambar 7) memberikan pita tunggal dengan BM sama, hal ini menunjukkan bahwa protein B7DEX tersusun oleh sebuah sub-unit. Dengan memasukkan data BM rata-rata asam amino sebesar 120 Da, ukuran gen yang menyandi enzim B7DEX dapat diperkirakan sebesar 1,813 kilobasa. Data ini beserta data BM merupakan informasi yang akan mengarahkan percobaan kloning gen *B7DEX*.

Data lain yang sangat diperlukan dalam perancangan primer untuk kloning gen *B7DEX* adalah urutan asam amino ujung-N serta data hasil penjajarannya. Hasil penjajaran ganda (*multiple alignment*) urutan asam amino ujung-N B7DEX menggunakan program Clustal W (Thomson et al., 1997) menunjukkan bahwa homologi (*similarity*) tinggi hanya terhadap urutan ujung-N dekstranase dari *Brevibacterium fuscum* (Bre.f), sebagai tertera pada Gambar 8. Penjajaran dua urutan ini tampak pada Gambar 9, yaitu menunjukkan tingkat homologi 100%.

Urutan asam amino pada GenBank/GenPeptide berasal dari *translate* urutan nukleotida hasil *sequencing* DNA. Residu ujung-N pada urutan-urutan yang ada di GenBank/GenPeptide adalah metionin (M), sebagian tampak di Gambar 8. Hal ini sesuai dengan proses sintesis protein bakteri, yang pada umumnya diawali dengan residu metionin. Adapun residu ujung-N B7DEX yang didapat, yang merupakan hasil penentuan menggunakan metode degradasi Edman, berupa residu alanin (A). Hal ini dapat

| | | |
|----------------|--|-----|
| A.g.1 | MPGTGLGR LAKHV TAAAAV FLISTGAVLPAQAETAPGSTPSAAPAASVEKHPIT TANNGN | 60 |
| CB-8 | MPGTGLGR LAKRMTAAAAV FFI STSAVLPAQAATAPAAA PPGVPAALKAERAI TTTVDNGN | 60 |
| Bre.f | MPTTGLRQLARTITIT IAVAATL IGTGAAI PAQAGPDRKNPT-----KPVEDAPVTADVGN | 54 |
| Isolat | -----APVTADVGN | 9 |
| Pen.f | -----MATMLKLLAL TLAI SE SAIGAVMHPPGV SHPGTHTGT TNNTHCGAD | 46 |
| P. minioluteum | -----MATMLKLLAL TLAI SE SAIGAVMHPPGV SHPGTHTGT TNNTHCGAD | 46 |
| As.n.=ipu | -----MRSTGYLLT LSAAFQVAQA AVTAN-----NSQ | 27 |
| | .. | |
| A.g.1 | LHTWWHDNGVFS PAAPTQSDEVR RSSLYDVRVAQ-ANQPQKAYDAFTYMSIPRSGKKGIG | 119 |
| CB-8 | LHTWWHDNGVFS PATPTQSSEVR RSSFYDVQVAQ-ANQPQKLYDAFSYMSIPRSGKKGIG | 119 |
| Bre.f | LHTWWHDNAVYNTDSPTENGEVR RSSFYDVQVAQ-AHQPKFFDSFAYMSIPRSGKKGIVG | 113 |
| Isolat | LHT----- | 12 |
| Pen.f | FCTWWHDSGEINTQTPVQPGNVRQSHKYSVQVS--LAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIY | 104 |
| P. minioluteum | FCTWWHDSGEINTQTPVQPGNVRQSHKYSVQVS--LAGTNNFHDSFVYESIPRNGNGRIY | 104 |
| As.n.=ipu | LLTWWHNTGEINTQTPVADGNVRQSGLYSVKVTTPASSSLYYSFVYLAIPGNG----- | 82 |
| | : * | |

Gambar 8. Penjajaran urutan asam amino ujung-N B7DEX (isolat) dengan dekstranase lain dalam famili B7DEX menggunakan program Clustal W

