

EXECUTIVE SUMMARY

HIBAH PENELITIAN DISERTASI DOKTOR



**KARAKTERISASI EKSO-XILANASE *PUTATIVE* REKOMBINAN
ASAL *Geobacillus thermoleovorans* IT-08**

Anak Agung Istri Ratnadewi, S. Si, M. Si

197012251997022001

UNIVERSITAS JEMBER

Desember 2013

ABSTRAK

Karakterisasi Eksoxilanase Putative Rekombinan Asal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08

¹A.A. Istri Ratnadewi

¹Jurusan Kimia Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember
Sumber Dana : Hibah Doktor DIPA 2013 Universitas Jember

Ekso-xilanase *putative* asal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 merupakan bagian gen klaster pengkode enzim xilanolitik dalam pTP510. Urutan nukleotida dari ekso-xilanase *putative* telah terdeposit dalam *GenBank* No. DQ387047 dan dikelompokkan dalam famili GH43. Ekso-xilanase *putative* diindikasikan sebagai enzim baru (enzim yang memiliki keunikan), didasarkan oleh homologi yang sangat rendah dengan enzim sejenisnya dalam famili GH43, didukung oleh analisis BLASTN, BLASTX dan homologi dengan Protein Data Bank (PDB) terhadap struktur enzim sejenisnya dalam keluarga GH43 menunjukkan homologi sebesar 19-37%. Berdasarkan data analisis tersebut di atas, maka perlu diteliti lebih lanjut karakteristik enzim yang meliputi karakterisasi gen, karakterisasi protein dan produk hidrolisisnya. Hasil karakterisasi ekso-xilanase menunjukkan enzim ini tidak termasuk xilanase yang bersifat ekso namun sebagai enzim β -xilosidase, yang selanjutnya dinamakan **GbtXyl43B**. Panjang gen *Gbtxyl43B* adalah 1815 bp, mengkode 604 asam amino dengan prediksi massa molekul relatif berkisar 74.5 kD. Untuk karakterisasi GbtXyl43B rekombinan, gen penyandi *Gbtxyl43B* dari *G. thermoleovorans* IT-08 diamplifikasi melalui PCR dan telah terklon dalam pET30a dan telah diekspresikan dalam *Escherichia coli*. Karakterisasi GbtXyl43B serta kinetika enzim telah diperoleh dalam penelitian ini. Produk gen rekombinan telah dimurnikan yang menunjukkan massa molekul relatif ~72 kDa yang ditunjukkan dari analisis SDS-PAGE. Enzim ini mempunyai temperatur dan pH optimum pada 60 °C dan 6.0. Stabilitas GbtXyl43B stabil pada 60 °C selama 1 jam dan pH 6–8 pada 4 °C selama 24 jam. Enzim ini mempunyai k_{cat} : $3.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, K_M : $6.6 \times 10^{-2} \text{ mM}$ dan efisiensi katalitik (k_{cat}/K_M) sebesar $4.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Analisis kromatografi lapis tipis menunjukkan GbtXyl43B merupakan eksoglikosidase menghasilkan xilosa dari ujung non pereduksi xilan. Aktifitas GbtXyl43B pada oat spelt xylan (xilan tidak larut) 8 kali lebih besar dari birchwood (xilan larut).

Kata Kunci : *Geobacillus thermoleovorans* IT-08; GH43; Xylanase; β -D-xilosidase

Executive Summary

Karakterisasi Ekso xilanase putative rekombinan asal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08

¹A.A. Istri Ratnadewi

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Email: dewi_pjw2003@yahoo.com

Latar Belakang Penelitian

Xilan (komponen utama hemiselulosa) adalah polisakarida linear penyusun tulang punggung yang terdiri dari ikatan β -D-(1 \rightarrow 4) xilopiranosida dan variasi gugus fungsional seperti (1 \rightarrow 2)- atau (1 \rightarrow 3)- α -L-arabinofuranosida, (1 \rightarrow 2)- α -D-asam glukuronik, dan O-2- atau O-3-gugus asetat yang terikat pada tulang punggung. Jumlah dan komposisi cabang yang terikat pada tulang punggung xilanopiranosida tergantung dari sumber biomassa. Degradasi komplit dari xilan melibatkan enzim seperti endo- β -D-1,4-xilanase (EC 3.2.1.8), β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glukuronidase (EC 3.2.1.139), asetilxilan esterase (EC 3.1.1.72) and asam ferulat esterase (EC 3.1.1.73) (Biely, 2003; Saha, 2003, Shallom & Shoham, 2003) Endo- β -D-1,4-xilanase mendegradasi ikatan internal xilosidik dari tulang punggung xilan memproduksi xilooligosakarida, diikuti oleh β -D-xilosidase yang menghidrolisis ujung non pereduksi dari fragmen xilobiosa dan xilooligosakarida menjadi xilosa. Enzim xilanolitik telah banyak diisolasi dari bakteri, jamur, alga laut, protozoa, serangga dan kacang-kacangan (Polizeli *et al.*, 2005; Sunna *et al.*, 1997). Enzim xilanolitik yang memiliki aktivitas ekstrem seperti termofilik, asidofilik atau alkalofilik dan halofilik menarik untuk diteliti, kondisi enzim ini sangat bermanfaat. Enzim ekstrem tersebut mempunyai peran penting dalam proses industri seperti pemutih kertas, meningkatkan daya cerna pada makanan hewan, pengolahan makanan untuk meningkatkan klarifikasi dan mengkonversi bahan lignoselulosa menjadi bahan baku dan bahan bakar. Oleh karena itu enzim dengan sifat ekstrem tersebut mempunyai sifat spesifik yang sangat diperlukan dalam aplikasi industri ramah lingkungan untuk hidrolisis xilan. Shoham dan tim penelitiannya telah menentukan struktur dari beberapa enzim xilanolitik dari bakteri thermostabil, alkalofilik dari *Geobacillus stearothermophilus* T-6 meliputi enzim endo- β -D-1,4-xilanase (Teplitsky *et al.*, 2004), β -D-xilosidase (Brux *et al.*, 2006), α -arabinofuranosidase (Hovel *et al.*, 2003), and α -glukuronidase (Golan *et al.*, 2004). Kami juga telah mengidentifikasi bakteri termofilik *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 yang dapat memproduksi enzim xilanolitik, yang diisolasi dari kawah panas Gunung Pancar, Bogor, Jawa Barat (Tan, 1999). Penelitian awal telah diperoleh gen klaster kelompok pengkode enzim xilanolitik dari *G. thermoleovorans* IT-08 melalui proses *shotgun cloning*. Gen klaster yang terisolasi mempunyai panjang 8444 bp nukleotida, yang mengandung 5 gen meliputi gen A (transposase), gen B (ABC permease), gen C (β -D-xilosidase, *xyl43B*, GenBank No. DQ387047), gen D (β -D-xilosidase, *xyl43A* GenBank No. DQ345777), dan gen E (arabinofuranosidase, *abfa51* GenBank No. DQ387046) (Puspaningsih, 2004). Masing-masing gen B, C, D dan E mempunyai *ribosom binding site* (RBS). *G. thermoleovorans* IT-08 mengekspresikan dua β -xilosidase berbeda dinamakan GbtXyl43A (dikode dari gen D) dan GbtXyl43B (dikode oleh gen C). Hal yang sangat menarik, GbtXyl43B dapat menghidrolisis xilan oat tetapi GbtXyl43A tidak mempunyai kemampuan tersebut, maka dalam penelitian ini, kami akan melaporkan karakteristik biokimia dari GbtXyl43B. Menurut basis data Carbohydrate Acting enZYme (CAZY) (<http://www.cazy.org>), β -D-xilosidase (E.C 3.2.1.37) dapat diklasifikasikan dalam 10 famili glikosida hidrolase (GH): 1, 3, 30, 39, 43, 51, 52, 54, 116 atau 120. Mereka dikelompokkan berdasarkan kemiripan urutan asam amino, struktur lipatan protein (folding protein), reaksi spesifik dan mekanisme kerja enzimnya (Dustin *et al.*,

2011). Ciri khas famili GH43 adalah memiliki struktur tiga dimensi yang terdiri dari lipatan lima bilah baling-baling β (*five-bladed β -propeller fold*) (Nurizzo *et al.*, 2002) dengan residu katalitik yang lestari: Asp sebagai nukleofil, Glu sebagai donor proton dan Asp lainnya sebagai pKa modulasi dan menjaga orientasi yang benar terhadap substrat dan menggunakan mekanisme membalik (*inverting*) melalui satu tahap reaksi. Menurut analisis filogenetika yang dibuat oleh Qiant (Qiant *et al.*, 2003), enzim dalam famili GH43 dapat dibagi dalam empat subfamili I dan II terdiri dari protein yang mengkode gen katabolisme xilosa, gen ini berikatan dengan ABC transferor atau permease. Subfamili III–IV terdiri dari beberapa protein yang mampu mengkatalisis polimer karbohidrat dan juga arabinase/arabinosidase *G. strearothermophilus* T-6 mengekspresikan β -D-xilosidase dalam tiga famili GH yang berbeda (Shallom *et al.*, 2005), namun tidak halnya dengan *G. thermoleovorans* IT-08 memproduksi GbtXyl43A dan GbtXyl43B diklasifikasikan dalam famili GH43 yang sama.

2. Rumusan Masalah

Bagaimana karakteristik dan profil produk hidrolisis xilan (larut dan tidak larut), arabinan, arabinosilan, xiloglukan dan fruktan, serta substrat kromogen (*pNPX*, *pNPXX*, *pNPA*) oleh GbtXyl43B. Residu asam amino apakah yang berperan dalam sisi katalitik GbtXyl43B. Perbandingan aktivitas antara GbtXyl43B varian dan GbtXyl43B asal (*wild type*)

3 Tujuan Penelitian

Mengkarakterisasi GbtXyl43B melalui: genetika untuk overekspresi gen *xyl43B* (tahap subkloning gen *xyl43B* dari pTP510 ke pET30a), karakteristik biokimia (massa molekul dan profil produk hidrolisisnya) dan rekayasa genetika sisi katalitik. Menentukan data kinetika kimia (K_M , V_{max} , k_{cat} dan k_{cat}/K_M)

4. Metodologi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia/Kimia Organik, Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi; Laboratorium Preteomik *Institute of Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga, Surabaya, Departemen Kimia, Institut Teknologi Bandung (ITB) dan *Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Bioresources, Mie University* Jepang (Program *Sandwich – DIKTI*).

a. Peremajaan Bakteri

Koloni tunggal bakteri diambil dengan ose steril dan ditumbuhkan pada media padat media LB untuk *E.coli TOP10* dan *BL21* (sel inang), media LB ampisilin untuk transforman yang membawa plasmid pTP510, media LB kanamisin untuk transforman yang membawa plasmid pET30a, *xyl43B* dan *xyl43B* varian. Selanjutnya diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 16-18 jam.

b. Teknik DNA Rekombinan

Secara ringkas teknik DNA rekombinan yang digunakan pada penelitian ini meliputi: preparasi DNA plasmid, amplifikasi fragmen DNA, pemotongan DNA dengan enzim restriksi, elektroforesis gel agarosa, pemurnian DNA dari ge agarosa, reaksi ligasi, sekuensing DNA sisipan.

c Metode Produksi Protein dan Analisis Protein

Tahapan ini meliputi: produksi dan pemurnian protein rekombinan dan varian, penentuan kadar protein dan uji aktivitas pada substrat spesifik

d. Karakterisasi Biokimia Enzim

Tahapan ini meliputi: penentuan massa molekul enzim, profil produk hidrolisis, karakterisasi terhadap pH dan temperatur, data kinetika kimia dan adsorbabilitas terhadap substrat xilan.

e. Bioinformatika

Berdasarkan protein homologi, model struktur tiga dimensi enzim dibentuk menggunakan program SWISS MODEL (<http://www.swissmodel.com>) (Arnold *et al.*, 2006), menggunakan struktur β -D-xilosidase dari *Clostridium acetobutylicum* (PDB No 3KIU) sebagai templet. Model struktur enzim digambarkan dengan program PyMOL Molecular Graphics System (Version 1.5.0.4). Analisis pohon filogenetika dari β -D-xilosidase dan CBM menggunakan program MEGA (v.5) (Tamura *et al.*, 2011) dan Sumber data pohon filogenetika dari basis data CAZY (<http://www.cazy.org/CBM>).

HASIL DAN PEMBAHASAN

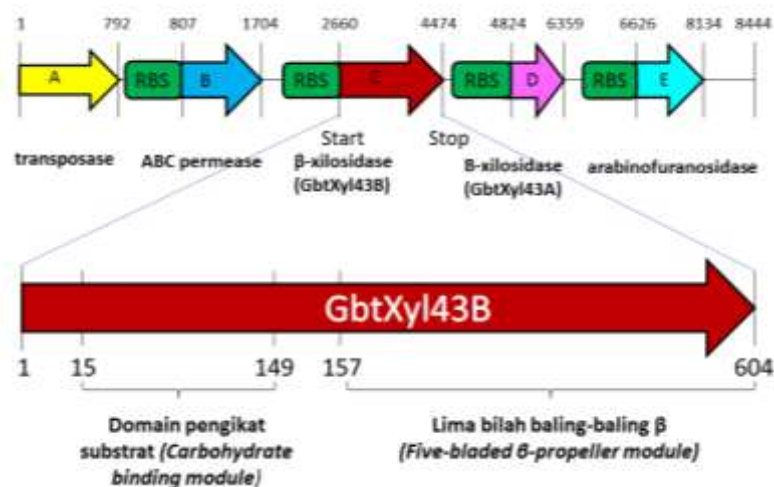
Dinding sel tumbuhan yang terdiri dari penyusun kompleks polisakarida (selulosa, hemiselulosa dan lignin) yang tersusun sangat teratur dan sulit larut. Hal tersebut membuat proses degradasi dinding sel tumbuhan secara enzimatik sangat rumit. β -D-xilosidase adalah bagian dari hemiselulase, yang mempunyai kemampuan menghidrolisis xilan. *G. thermoleovorans* IT-08 mengandung klaster gen enzim xilanolitik diantaranya *xyl43B*. Gen ini dapat memproduksi β -D-xilosidase yang mampu menghidrolisis xilan larut yaitu xilan birchwood dan tidak larut yaitu xilan oat. Selanjutnya, GbtXyl43B dieksplorasi untuk dapat menjelaskan aktivitas xilanolitik.

a. Topologi dari GbtXyl43B

Awalnya GbtXyl43B diduga sebagai eksoxilanase (Puspaningsih, 2004) dan hanya urutan nukleotida dari gen ini yang disimpan pada GenBank No DQ387047. Hasil BLASTN menunjukkan bahwa *xyl43B* tidak memiliki homologi dengan urutan nukleotida gen sejenis lainnya pada basis data GenBank, sedangkan BLASTX menunjukkan adanya homologi dengan protein yang belum terkarakterisasi sampai dengan 70%. Namun, homologi dengan famili GH43 yang telah ditentukan strukturnya menunjukkan homologi sebesar 19–37%. Lebih jauh, analisis urutan nukleotida *xyl43B* pada daerah hulu tidak ditemukan urutan signal peptida dalam *xyl43B*. Namun, faktanya *xyl43B* dari *G. thermoleovorans* IT-08 mengekspresikan GbtXyl43B secara ekstrasel. Fenomena ini di atas menunjukkan peran transposase dan ABC permease dalam sistem ekspresi di *G. thermoleovorans* IT-08 (Gambar 1). Gen ABC permease dari *G. thermoleovorans* IT-08 menunjukkan homologi 85% dengan ABC transporter permease II dari *Paenibacillus* sp. oral taxon 786, dan 76% dengan binding protein dari *Paenibacillus* sp. Y412MC10. Beberapa laporan menjelaskan bahwa ABC transporter adalah protein esensial untuk transport setiap molekul yang melewati membran selular (Higgins, 2001; Shulami *et al.*, 2007; Low *et al.*, 2011). Beberapa sistem ABC transporter untuk hemiselulosa telah dikarakteristik seperti YxdLM dari *Bacillus subtilis* (Joseph *et al.*, 2004) dan xynEFG dari *G. stearothermophilus* T-6 (Shulami *et al.*, 2006).

Urutan GbtXyl43B diperkirakan terdiri dari 604 residu asam amino, namun GbtXyl43B rekombinan terdapat tambahan 53 residu asam amino pada ujung-N terminal dari sistem ekspresi, mengandung CBM (residu asam amino 15–149) yang dihubungkan melalui 8 residu asam amino sebagai penghubung menuju ke CM (residu asam amino 157–604). Urutan GbtXyl43B menunjukkan homologi maksimum hanya 19% dengan urutan XynB3 dari *G. stearothermophilus*

T-6 (GenBank No. AAT98625) (Shallom et al., 2005) dengan perbedaan yang signifikan pada CBM tetapi tidak dengan CM.



Gambar 1 Lokasi gen *GbtXyl43B* dan gen lainnya dalam pTP510

b. Sub-Kloning dan Sekuensing *xyl43B*

Untuk karakteristik *GbtXyl43B*, gen *xyl43B* diamplifikasi melalui PCR dan di subklon dari pTP510 ke dalam plasmid ekspresi pET30a dan dioverekspresi di dalam *E.coli* B121(DE3).

Amplifikasi gen *xyl43B* secara PCR membutuhkan sepasang primer yang sesuai. Urutan basa nuklotida kedua primer ini dapat dilihat pada Tabel 1. Basa nukleotida yang dicetak miring dalam primer pFSacI-ekso merupakan sisi pengenalan *SacI* (GAGCTC) sedang basa yang dicetak miring dalam primer pRXhoI-ekso merupakan sisi pengenalan *XhoI* (CTCGAG)

Tabel 1 Hasil desain primer pFSacI-*Xyl43B* dan pRXho-*Xyl43B* untuk amplifikasi PCR gen *xyl43B* dari plasmid pTP510 ke plasmid pET30a

Nama	Uutan basa nukleotida	Panjang primer	Panjang amplikon
pFSacI-ekso	5' <i>GCGAGCTCATGACTTTACA</i> GACGAATA3'	27 bp	1800 bp
pRXhoI-ekso	5' <i>CGCTCGAGTTAAGTCAAAA</i> TGACATCC3'	27 bp	

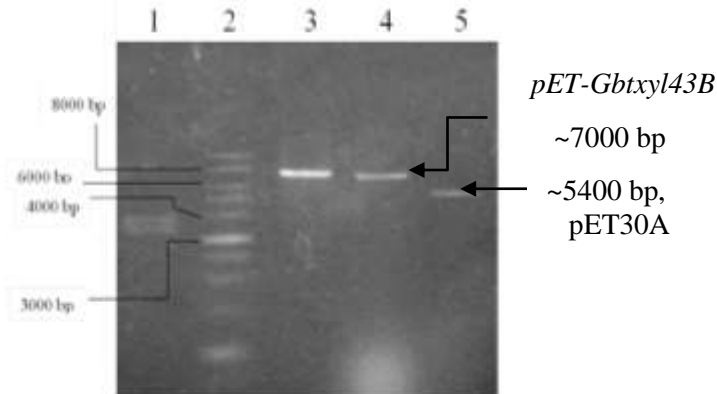
Amplikon gen *xyl43B* yang telah dimurnikan dan plasmid pET30a masing-masing dipotong dengan enzim restriksi yang sama, yaitu *SacI* dan *XhoI*. Fragmen DNA dan plasmid diligasi dengan enzim T4 ligase kemudian diinkubasi pada temperatur 16 °C selama semalam. Hasil ligasi ini segera ditransformasi ke sel kompeten *E.coli* TOP10 (Sambrook et al., 1989). Transforman yang tumbuh di media LB+kanamisin selanjutnya diisolasi DNA plasmid rekombinan dengan cara miniprep untuk dilakukan analisis restriksi. Hasil analisis restriksi DNA plasmid rekombinan dapat dilihat pada Gambar 2

Berdasarkan data elektroforegram pada Gambar 2 menunjukkan isolasi DNA plasmid rekombinan yang telah dipotong *BglI* menunjukkan 2 pita pada ukuran ~ 4000 bp dan ~3000 bp dan DNA plasmid rekombinan dipotong dengan *XhoI* dan *EcoRV* menunjukkan pita berukuran ~ 7000 bp. Dari gambar peta pasmid pET30a telah diketahui bahwa ukurannya ~ 5400 bp, sedang ukuran gen *xyl43B* yang diamplifikasi dari plasmid pTP510 sekitar ~1800 bp. DNA hasil ligasi

berukuran ~ 7000 bp dari gen *xyl43B* (~1800 bp) dan pET30a (~5400 bp). Hasil di atas dapat disimpulkan bahwa *E.coli* TOP10 transforman telah membawa gen *pET-xyl43B* yaitu plasmid pET30a yang telah tersisipi gen *xyl43B*

Urutan gen *xyl43B* ~ 1800 bp yang terdapat pET30a ditentukan dengan metode Sanger menggunakan sepasang primer T7 promotor (maju dan mundur) Promotor T7 merupakan bagian dari pET30a. Hasil penentuan urutan nukleotida diperoleh ~1800 bp, yang merupakan ORF dari gen *xyl43B*, urutan tersebut diawali dengan ATG yaitu kodon start dan diakhiri kodon stop TAA dari gen penyandi GbtXyl43B.

Hasil penentuan urutan nukleotida gen *pET-xyl43B* menunjukkan bahwa gen *xyl43B* telah tersisipi ke dalam pET30a secara utuh sehingga gen *pET-xyl43B* selanjutnya dapat digunakan untuk tahapan ekspresi dan purifikasi protein.

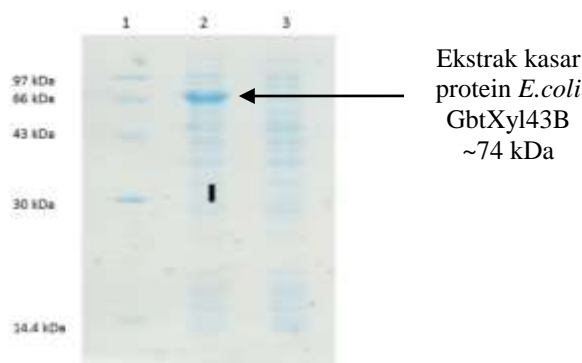


Gambar 2 Elektroforegram hasil analisis restriksi DNA plasmid rekombinan *pET-xyl43B* dan pET30a (1) *pET-xyl43B* rekombinan yang dipotong *BglI*; (2) DNA penanda 1kb ladder; (3) *pET-xyl43B* rekombinan yang dipotong *XhoI*; (4) *pET-xyl43B* rekombinan yang dipotong *EcoRV* dan (5) plasmid pET30a dipotong *XhoI*

c. Ekspresi Protein GbtXyl43B Rekombinan di *E.coli* BL21(DE3)

E.coli BL21 (DE3) merupakan galur *E.coli* yang membawa T7 RNA polimerase dari bakteriofage λ DE3 yang terintegrasi dalam kromosom *E.coli* BL21. Ekspresi plasmid pET30a dikendalikan oleh promotor T7 dan pada ujung N terminal mengandung 6 asam amino histidin secara berurutan (His_6), ke 6 gen penyandi histidin ini akan terekspresi bersama-sama protein target (His_6 -prot). Protein target yang mengandung His_6 selanjutnya akan menyerderhanakan tahapan pemurnian protein target. Gen *pET-xyl43B* mengekspresikan protein GbtXyl43B rekombinan secara intraselular. GbtXyl43B rekombinan terdiri dari 657 residu asam amino mengandung linker residu dan His-tag *fusion*.

Gambar 3 menunjukkan SDS-PAGE ekstrak kasar protein GbtXyl43B rekombinan mempunyai massa molekul relatif ~ 72 kDa. Kontrol negatif digunakan *E.coli* BL21 yang membawa plasmid pET30a tanpa sisipan gen *xyl43B*. Hasil elektroforesis menunjukkan perbedaan pola yang signifikan antara ekstrak kasar protein sampel dan kontrol negatif. Pada ekstrak kasar protein *E.coli* GbtXyl43B rekombinan diperlihatkan adanya pola overekspresi dengan massa molekul relatif ~72 kDa, sedangkan pada protein kontrol tidak ada pola overekspresi dengan massa molekul relatif ~72 kDa. Hal ini membuktikan bahwa gen *xyl43B* dalam plasmid pET30a dapat mengekspresikan protein rekombinan dengan tingkat konsentrasi selular tinggi dalam sel *E.coli* BL21(DE3).



Gambar 3. Elektrofogram ekspresi protein GbtXyl43B rekombinan . (1) *Low Molekul Weight*, (2) ekstrak kasar protein *E.coli* GbtXyl43B rekombinan dan (3) protein kontrol *E.coli* (pET30a tanpa sisipan gen *xyI43B*)

d. Purifikasi GbtXyl43B Rekombinan

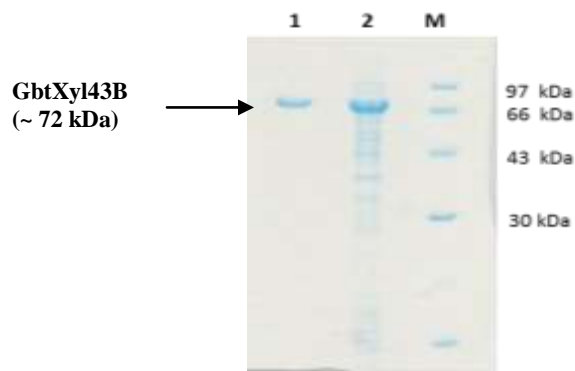
GbtXyl43B rekombinan murni diperoleh melalui tahapan pemurnian yaitu tahap pemanasan dan kromatografi afinitas (kolom Hi-trap chelating). Tahap pertama diawali pemanasan pada 50 °C selama 30 menit, dengan tujuan protein-protein yang bukan bersifat termofilik akan terpisah atau terendapkan. Tahapan selanjutnya yaitu tahapan pemurnian dengan kromatografi afinitas.

Kromatografi afinitas bekerja atas dasar interaksi antara ion logam yang terikat pada kolom dan residu asam amino. Asam amino dapat berperan sebagai donor elektron pada kelat ion logam sehingga akan menahan protein pada kolom. Dalam penelitian ini, ion logam yang digunakan adalah ion nikel dan asam amino sebagai donor elektron adalah residu histidin yang berada pada ujung-N GbtXyl43B rekombinan. Protein-protein yang terikat tidak spesifik atau protein-protein lain yang mungkin mengandung residu asam amino yang berinteraksi lemah dengan ion nikel, dapat dielusi dengan bufer yang mengandung gradien imidazol dengan demikian GbtXyl43B rekombinan dapat dipisahkan dari ekstrak kasar.

Hasil pemurnian protein GbtXyl43B rekombinan tertera pada Gambar 4, menunjukkan protein GbtXyl43B rekombinan satu pita berukuran berkisar ~72 kDa. Tabel 2 menunjukkan tabel pemurnian untuk protein GbtXy43B rekombinan. Dari data diatas dapat disimpulkan protein GbtXyl43B rekombinan dapat dimurnikan dengan kemurniaan mencapai 28,2% dan kelipatan kemurnian 34 dari ekstrak kasar

Tabel 2 Pemurnian GbtXyl43B rekombinan

Sampel	Volume (mL)	Protein total (mg)	Aktivitas total (Unit)	Aktivitas spesifik (Unit/mg ⁻¹)	Hasil (%)	Kelipatan kemurnian
Ekstrak kasar	20	69,2	98,3	1,42	100	1
Fraksi kolom afinitas	1	0,57	27,7	48,4	28,2	34



Gambar 4 Elektrofogram protein GbtXyl43B rekombinan (1) Protein murni GbtXyl43B rekombinan; (2) Ekstrak kasar protein *E.coli* GbtXyl43B dan (3) Standar Protein *Low Molekul Weight*.

e. Karakterisasi GbtXyl43B Rekombinan

Aktivitas GbtXyl43B pada berbagai substrat

Famili GH43 meliputi enzim β -xilosidase arabinofuranosidase, bifungsional xilosidase/arabinofuranosidase, xilanase dan glukonase. Famili GH43 merupakan kelompok enzim dengan spesifikasi yang sangat luas terhadap substrat, sehingga dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas terhadap GbtXyl43B rekombinan pada berbagai macam substrat alami dan sintetik seperti Tabel 3.

Dari hasil uji terhadap berbagai macam substrat spesifik, GbtXyl43B rekombinan mempunyai aktivitas tertinggi terhadap substrat sintetik *p*NPX dan aktivitas yang rendah pada substrat alami yaitu substrat xilan oat dan xilan birchwood. GbtXyl43B rekombinan tidak mampu menghidrolisis substrat arabinan, rye arabinoxilan. Ini menunjukkan GbtXyl43B rekombinan merupakan β -xilosidase dan tidak memiliki aktivitas arabinofuranosidase, hal ini berbeda dengan GbtXyl43A yang bersifat bifungsional. Disamping itu GbtXyl43B rekombinan juga tidak memiliki aktivitas terhadap substrat glukon seperti xiloglukan. Pengujian aktivitas GbtXyl43B rekombinan juga dilakukan terhadap dengan substrat ketose yang produknya dianalisis secara kromatografi lapis tipis (KLT). Analisis ini dilakukan untuk menguji substrat di luar famili GH43. Pengujian terhadap substrat ketose dilakukan untuk famili GH32 yaitu menghasilkan fruktosa. Hasil menunjukkan bahwa GbtXyl43B rekombinan tidak memiliki aktivitas terhadap substrat ketose.

Tabel 3 Aktivitas GbtXyl43B rekombinan terhadap berbagai substrat spesifik

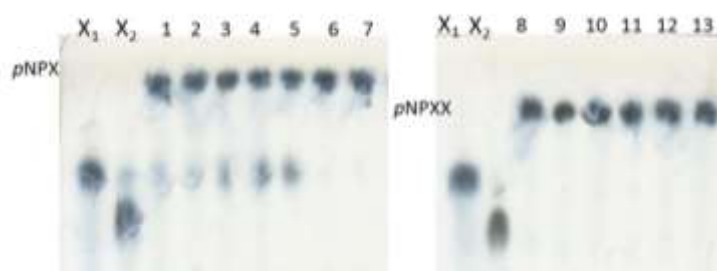
Substrat spesifik (U/mg protein)	Aktivitas
<i>p</i> NP- β -D-xylopyranoside(<i>p</i> NPX)	48,4 \pm 0.3
<i>p</i> NP- α -L-arabinofuranosid (<i>p</i> NPA)	tidak ada
Xilan Oat	4,15 \pm 1,18
Xilan Birchwood	0,44 \pm 0,13
Arabinan	tidak ada
Ryearabinoxilan	tidak ada
Xiloglukan	tidak ada
Ketose	tidak ada

Pengujian dengan berbagai substrat spesifik mengidentifikasi bahwa GbtXyl43B rekombinan merupakan β -xilosidase yang kedua dalam *G. thermoleovorans* IT-08. GbtXyl43B

rekombinan hanya mampu menghidrolisis substrat spesifik *p*NPX dengan aktivitas yang lebih tinggi dibanding substrat xilana oat dan xilana birchwood.

Analisis produk hidrolisis GbtXyl43B rekombinan

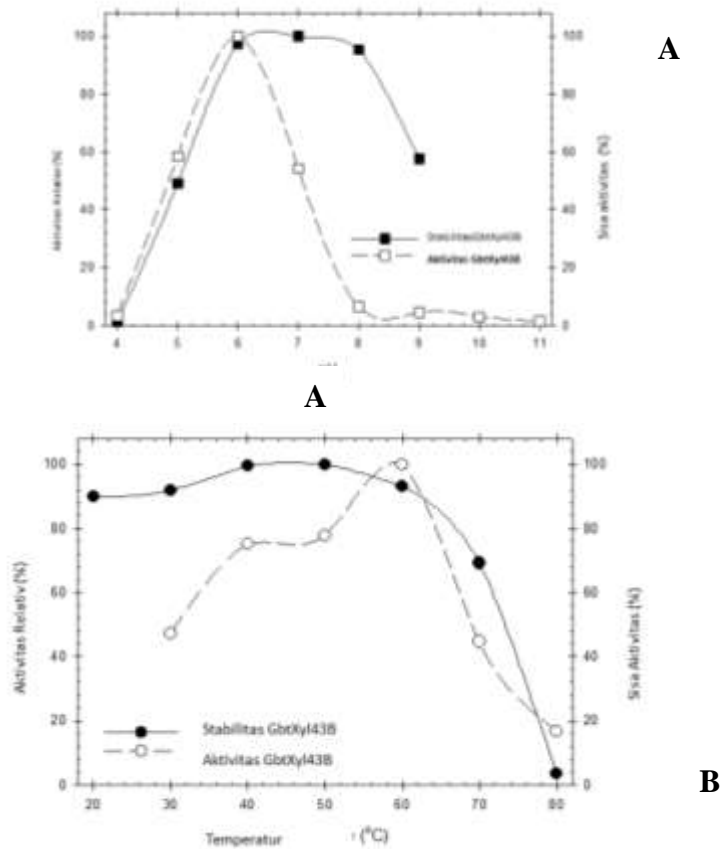
Produk hidrolisis substrat *p*NPX (*p*NP- β -D-xylanopyranoside) dan *p*NPXX (*p*NP- β -D-xylobioside) oleh GbtXyl43B dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Produk yang dihasilkan pada reaksi tersebut adalah xilosa, disamping sisa *p*NPX. Intensitas noda untuk xilosa yang semakin tebal ditunjukkan dengan bertambahnya waktu inkubasi antara *p*NPX dan GbtXyl43B rekombinan. Hal ini mengkonfirmasi nilai konsentrasi xilosa yg semakin meningkat dengan meningkatnya waktu inkubasi. Lebih jauh pada *p*NPXX tidak menunjukkan adanya xilosa ataupun xilobiosa dan spot diatas standar merupakan spot *p*NPXX (Gambar 5). Hasil analisis KLT menunjukkan GbtXyl43B rekombinan mampu menghidrolisis *p*NPX menghasilkan xilosa namun tidak demikian dengan *p*NPXX, mengindikasikan GbtXyl43B adalah β -xilosidase yang mempunyai aktivitas pada ujung non pereduksi yang hanya melepaskan xilosa



Gambar 5 Produk Hidrolisis substrat *p*NPX dan *p*NPXX oleh GbtXyl43B rekombinan, X₁ dan X₂ adalah xilosa dan xilobiosa, (1)–(5) produk hidrolisis GbtXyl43B rekombinan dengan substrat *p*NPX pada inkubasi berturut-turut 10, 20, 30, 40 dan 50 menit, (6) *p*NPX (tanpa GbtXyl43B), (7) produk hidrolisis GbtXyl43B rekombinan inaktif dengan substrat *p*NPX, (8)–(11) produk hidrolisis GbtXyl43B rekombinan dengan substrat *p*NPXX pada inkubasi berturut-turut 10, 20, 30 dan 40 menit, (12) *p*NPXX; (13) produk hidrolisis GbtXyl43B rekombinan inaktif dengan substrat *p*NPXX

pH dan temperatur optimum dari GbtXyl43B rekombinan

Kondisi pH dan temperatur optimum, dan kestabilan dari GbtXyl43B rekombinan pada *p*NPX sebagai substrat ditentukan dengan mengukur aktivitas total GbtXyl43B. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μ mol *p*-nitrofenol dalam waktu 1 menit pada kondisi percobaan. Kondisi pH dalam pengujian aktivitas GbtXyl43B rekombinan ditentukan antara pH 4 dan 11 dan kestabilan pH ditentukan antara 4 dan 9 dengan interval 1 satuan. Gambar 6 (A), menunjukkan pH optimum dari GbtXyl43B rekombinan pada pH 6 (39,74 IU/mg) dan kestabilan pH pada kondisi lingkungan pH 6–8. Aktivitas 50% dari GbtXyl43B rekombinan terdeteksi pada pH 5–7. GbtXyl43B rekombinan mempunyai aktivitas lebih dari 50% pada 40–65 °C (Gambar 6 B). Kondisi temperatur dalam pengujian aktivitas GbtXyl43B ditentukan pada rentang 30–80 °C, sedangkan rentang kestabilan pada rentang 20–80 °C. Temperatur optimum GbtXyl43B rekombinan pada 60 °C sebesar 40,66 IU/mg. GbtXyl43B rekombinan menunjukkan kestabilan temperatur dengan pemanasan 1 jam sampai 70 °C dan menunjukkan aktivitas yang dicapai lebih dari 70%. Kondisi pH dan temperatur optimum GbtXyl43B rekombinan mirip dengan GbtXyl43A yang juga dari *G. thermoleovorans* IT-08.



Gambar 6 Pengaruh pH (A) and Temperatur (B) pada aktivitas dan stabilitas GbtXyl43B rekombinan.

Pengukuran kinetika GbtXyl43B rekombinan

Parameter kinetik GbtXyl43B rekombinan ditentukan untuk mengetahui afinitas substrat dan efisiensi katalitik dari GbtXyl43B rekombinan. Parameter kinetik ditentukan pada penelitian ini adalah K_M , V_{max} , k_{cat} dan k_{cat}/K_M . Tetapan Michaelis-Menten (K_M) dinyatakan sebagai konsentrasi substrat saat laju reaksi setengah dari V_{max} . Nilai K_M menunjukkan besarnya afinitas enzim terhadap substrat. Semakin tinggi nilai K_M maka semakin kecil afinitas enzim terhadap substrat. V_{max} adalah laju maksimal yang dicapai enzim saat konsentrasi substrat tinggi. Nilai K_M dan V_{max} diperoleh dari pengamatan reaksi GbtXyl43B pada berbagai konsentrasi p NPX (75, 112,5, 150, 187 dan 225 mM) selama 30 menit. Dari kurva kinetik reaksi tersebut diperoleh nilai laju inisial (V_0) pada masing-masing konsentrasi substrat (Lampiran X) Dari laju inisial (V_0) pada masing-masing konsentrasi substrat, selanjutnya dialurkan pada alur Lineweaver-Burk

Parameter kinetika pada substrat p NPX menunjukkan nilai K_M GbtXyl43B ($0,066 \pm 0,022$ mM), nilai ini lebih rendah di banding nilai K_M dari XynB3 (17 mM). Hal ini menunjukkan nilai afinitas enzim GbtXyl43B terhadap substrat p NPX lebih tinggi dari XynB3, namun nilai k_{cat} GbtXyl43B ($3,2 \times 10^{-4} \pm 1,76 \times 10^{-5} s^{-1}$) lebih rendah dibanding XynB3 ($57 s^{-1}$). Nilai k_{cat} (s^{-1}) merupakan pengukuran kecepatan proses katalitik yang disebut sebagai angka balik (*turnover number*). Hal ini menunjukkan proses kecepatan katalitik dari kompleks enzim substrat menjadi produk pada GbtXyl43B lebih lambat dibanding dengan XynB3. Namun nilai k_{cat}/K_M dari kedua xilosidase relatif rendah dibanding nilai enzim hidrolase lainnya

KESIMPULAN

β -xilosidase asal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 yang dinamakan GbtXyl43B mempunyai karakter sebagai berikut :

- 1) Panjang gen sebesar 1815 bp, mengkode 604 asam amino dengan prediksi massa molekul relatif berkisar 74,5 kDa.
- 2) Spesifikasi GbtXyl43B, menunjukkan aktivitas terhadap substrat spesifik pNPX, xilan oat, xilan birchwood serta tidak menunjukkan aktifitas terhadap substrat spesifik pNPA, arabinan, rye arabinan dan ketosa
- 3) Karakterisasi pH dan suhu, mempunyai pH 6 dan temperatur optimum 60 °C serta stabilitas pH 6–9 dan temperatur pada 20 °C–60 °C. Pohon filogenetik menunjukkan bahwa GbtXyl43B adalah termasuk subfamili IV dalam famili GH43
- 4) GbtXyl43B mempunyai nilai parameter kinetika terhadap substrat pNPX seperti K_M sebesar $6,6 \times 10^{-2}$ mM, V_{max} sebesar $1,9 \times 10^{-4}$ mM/menit, k_{cat} sebesar $3,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ dan k_{cat}/K_M sebesar $4,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$

Referensi

- Biely, P., Mackenzie, C. R., Schneider, H., and Puls, J. 1987. The Role of Fungal Acetyl Xylan Esterases in the Degradation of Acetyl Xylan by Fungal Xylanases. In Kennedy, J. F., Phillips, G. O., and Williams, P. A. (Eds.), Wood and Cellulosics. New York : Ellis Horwood, Ltd. pp. 283-289.
- Dustin, R., S., & Dagget, V. 2011. Protein folds and protein folding, Rew. *Journal Protein Engineering, Design & Selection*, 24; 11–19
- Golan, G., Shallom, D., Teplitsky, A., Zaide, G., Shulami, S., Baasov, T., Stojanoff, V., Thompson, A., Shoham, Y., & Shoham, G. 2004. Crystal structures of *Geobacillus stearothermophilus* α -glucuronidase complexed with its substrate and products: mechanistic implications. *Journal Biological Chemistry*, 279; 3014–3024.
- Matsumura, S., Sakiyama, K., and Toshima, K. 1999. Preparation of Octyl- β -D-Xylobioside and Xyloside by Xylanase Catalyzed Direct Transglycosylation Reaction of Xylan and Octanol, *Biotechnology Letters* 21 (1, January) : 17–22.
- Puspaningsih, N. N. T. 2004. Pencirian Enzim Xilanolitik dan Kloning Gen Penyandi Xilosidase dari *Bacillus thermoleovorans* IT-08. Disertasi Program Studi Biologi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor : Institut Pertanian Bogor. 119 hal.
- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., & Amorim, D.S. 2005. Xylanase from fungi properties and industrial applications. *Journal. Applied Microbiology Biotechnology*, 67; 577–591.
- Sunna, A., & Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Review in Biotechnology*, 17 : 39–67
- Sunna, A., & Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Review in Biotechnology*, 17 : 39–67
- Saha, B. C. 2000. α -L-Arabinofuranosidases : Biochemistry, Molecular Biology and Application in Biotechnology. *Biotechnology Advances* 18 (5, August) : 403-423.
- Saha, B. C. 2003. Hemicellulose Bioconversion. Review Paper. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30 (5, May) : 279 -291.

- Shallom, D., Belakhov, V., Solomon, D., Shoham, G., Baasov, T., and Shoham, Y. 2002. Detailed Kinetic Analysis and Identification of the Nucleophile in α -L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a Family 51 Glycoside Hydrolase. *Journal of Biological Chemistry* 277 (46, November) : 43667-43673.
- Shallom, D., and Shoham, Y. 2003. Microbial Hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 6 : 219-228.
- Qian, Y., Yamano, L. P., Preston, J. F., Aldrich, H. C., & Ingram, L. O. 2003. Cloning, characterization, and functional expression of the *Klebsiella oxytoca* xylo-dextrin utilization operon (xynTB) in *E.coli*. *Journal Applied Environmental Microbiology*, 69; 5957–5967.

Kata kunci ; Eksoxilanase, GbtXyl43B, *Geobacillus thermoleovorans* IT-08, GH43