

**EFEK PENAMBAHAN α -GALAKTOSIDASE
FAMILI 27 GLIKOSIDA HIDROLASE *Bacillus halodurans*
TERHADAP KEKENTALAN GUAR GUM**

*Andian Ari Anggraeni
(Dosen Jurusan Pendidikan Teknik Boga dan Busana FT UNY)*

ABSTRAK

*Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari aktivitas protein hasil translasi gen α -galaktosidase dari *Bacillus halodurans* famili 27 glikosida hidrolase dengan cara mengamati pengaruh penambahan protein terhadap kekentalan larutan guar gum.*

*Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode eksperimen. α -Galaktosidase adalah enzim yang mengkatalisasi hidrolisis ikatan α -1,6-galaktosida dari terminal non-reducing pada oligosakarida, liposakarida dan/atau polisakarida yang mengandung galaktosa. Protein rekombinan yang diekspresikan oleh gen α -galaktosidase BH1870 *Bacillus halodurans* dipurifikasi menggunakan His-binding metal affinity chromatography. Uji aktivitas dilakukan dengan menggunakan substrat guar gum pada beberapa interval suhu, yaitu 37, 45, 55 dan 65° C.*

*Enzim ini mampu menghidrolisa guar gum pada suhu 37 °C, yang ditunjukkan dengan penurunan kekentalan larutan guar gum. Namun, enzim ini tidak stabil pada suhu yang lebih besar dari 37 °C. Beberapa residu asam amino yang dianggap penting bagi aktivitas hidrolisis enzim famili 27 ternyata tidak terdapat pada *B. halodurans* α -galaktosidase. Ketiadaan residu ini mungkin dapat mempengaruhi kestabilan enzim pada suhu tinggi. Untuk membuktikan asumsi ini, diperlukan studi lanjut tentang site-directed mutagenesis pada residu-residu ini.*

*Kata kunci: α -galaktosidase; *Bacillus halodurans*; famili 27; glikosida hidrolase; guar gum*

PENDAHULUAN

α -Galaktosidase (α -D-galactoside galactohydrolase; melibiase; EC 3.2.1.22) adalah enzim yang mengkatalisis hidrolisis ikatan α -1,6-galaktosida dari terminal *non-reducing* pada oligosakarida, liposakarida dan/atau polisakarida yang mengandung galaktosa. α -Galaktosidase terdapat pada bakteri (Fridjonsson, O., 1999, Jindou, S., 2001, King, M.R., 1998, Liebl, W., 1998, Post, D.A., 2005), *fungi* (Baik, S.H., 2000), *yeast* (Turakainen, H., 1991), tumbuhan (Kim, W.D., 2003), hewan (Ohshima, T., 1995) dan manusia (Bishop, D.F., 1986). Beberapa enzim ini telah dipurifikasi dan dikarakterisasi.

Berdasar pada homologi sekuen asam amino, α -galaktosidase dikelompokkan dalam famili 4, 27, 36 dan 57 glikosida hidrolase (Henrissat, B., 1996). Sebagian besar α -galaktosidase eukariot menunjukkan homologi sekuen asam amino yang cukup signifikan dan dikelompokkan dalam famili 27. Sampai saat ini, beberapa α -galaktosidase yang berasal dari bakteri telah dikarakterisasi dan dikelompokkan dalam famili 4, 36 dan 57, kecuali *Clostridium josui* Aga27A (Jindou, S., 2001) dan *Saccharopolyspora erythraea* Mela (Post, D.A., 2005).

α -Galaktosidase memiliki aktivitas pada beberapa jenis

substrat, meliputi substrat alami seperti melibiosa, raffinosa, stakhiosa, dan verbakosa; substrat sintetik seperti *p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside dan methyl- α -D-galactopyranoside; dan juga polimer seperti galaktomannan (Dey, P.M., 1984). Berdasarkan substratnya, α -galaktosidase diklasifikasi menjadi 2 kelompok. Kelompok pertama adalah α -galaktosidase yang mempunyai aktivitas pada substrat dengan berat molekul rendah, seperti *p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside, melibiosa, raffinosa dan stakhiosa. Kelompok kedua adalah α -galaktosidase yang mempunyai aktivitas pada substrat dengan berat molekul rendah maupun pada polisakarida seperti guar gum (Kim, W.D., 2003).

Guar gum adalah polisakarida yang secara natural terdapat di alam. Guar gum tersusun dari rantai utama yang terdiri dari β -1,4-mannosa dan rantai cabang yang berupa α -1,6-galaktosa. Rasio antara mannanosa dan galaktosa adalah sekitar 2. Guar gum digunakan untuk berbagai macam produk karena guar gum dapat membentuk larutan yang kental. Guar gum dapat dimodifikasi dengan proses kimia, termal maupun mekanis. Meskipun demikian, proses degradasi secara biologis menggunakan enzim adalah alternatif utama karena enzim mempunyai spesifitas yang tinggi. Modifikasi guar gum akan menghasilkan senyawa turunan yang memiliki tingkat kekentalan yang berbeda-beda. Guar gum dan senyawa turunannya banyak

digunakan dalam produk pangan, tekstil, *oil recovery*, detergen, obat-obatan, kosmetik dan produk perawatan tubuh. Guar gum, yang aman untuk digunakan dalam bahan makanan, biasanya dicampur dengan biopolimer lainnya untuk memperkental bahan pangan (Goldstein, A.M., 1973).

Penggunaan guar gum untuk berbagai macam produk memerlukan pengontrolan sifat-sifat senyawa turunan guar gum, yang meliputi berat molekul, reologi dan struktur mikro. Guar gum yang terhidrolisis sebagian dapat digunakan sebagai substitusi untuk *dietary fiber* karena sangat larut dalam air dan encer. Guar gum banyak digunakan dalam industri pangan. Interaksi molekular antara guar gum dengan bahan pangan lainnya dapat dikontrol dengan depolimerisasi guar gum dan mengubah rasio mannososa/galaktosa untuk mengoptimalkan komposisi bahan pangan tanpa mengubah fungsinya. Degradasi guar gum juga dapat digunakan untuk memproduksi berbagai macam oligomer galaktosa atau mannososa (Goldstein, A.M., 1973).

Guar gum dapat didegradasi oleh tiga jenis enzim; β -mannanase yang menghidrolisis ikatan β -1,4 pada rantai utama yang terdiri dari mannososa, β -mannosidase yang memotong ikatan β -1,4 yang terletak pada ujung rantai utama, dan α -galaktosidase yang memotong ikatan α -1,6 antara mannososa dan galaktosa.

Fokus utama modifikasi enzimatis guar gum adalah hidrolisis rantai mannosa untuk mengurangi kekentalan dan modifikasi struktur dengan cara memotong rantai galaktosa. Penambahan β -mannanase atau α -galaktosidase ke dalam larutan guar gum akan mengurangi kekentalan larutan. Namun, penambahan kombinasi β -mannanase dan α -galaktosidase akan semakin memperbesar pengurangan kekentalan larutan.

Dalam industri makanan, α -galaktosidase digunakan pada industri gula. Raffinosa banyak terdapat pada tebu. α -Galaktosidase digunakan untuk meningkatkan produksi sukrosa dengan cara mengurangi raffinosa, yang akan mencegah kristalisasi normal pada gula (Yamane, T., 1971).

Melibiosa, raffinosa, stakhiosa dan verbascosa juga terdapat pada jamur, kacang-kacangan dan sayuran. Sistem pencernaan manusia dan hewan memamah-biak kekurangan α -galaktosidase. Oleh karena itu, senyawa yang mengandung α -1,6-galaktosida tidak dapat dicerna di dalam usus. Senyawa ini kemudian terdekomposisi oleh bakteri di dalam usus sehingga terbentuk gas CH₄, CO₂ dan H₂ yang mengakibatkan perut menjadi kembung. Untuk menghindari hal ini, sebelum makan disarankan untuk menggunakan suplemen yang mengandung α -galaktosidase yang berasal dari mikroba (Calloway, D., 1971).

Kedelai banyak dikonsumsi di seluruh dunia. Kandungan oligosakarida utama dalam kedelai adalah sukrosa, raffinosa dan stakhiosa. Penggunaan kedelai dibatasi oleh adanya bau yang khas serta kandungan raffinosa dan stakhiosa. Karena sistem pencernaan manusia tidak dapat mencerna raffinosa dan stakhiosa, komponen ini akan terdekomposisi oleh bakteri usus sehingga menghasilkan gas yang menyebabkan perut menjadi kembung. Proses pemasakan tidak akan menghilangkan kandungan raffinosa dan stakhiosa. Usaha untuk mengurangi kandungan raffinosa dan stakhiosa telah dilakukan dengan metoda *bleaching*, ultrafiltrasi dan hidrolisis enzim, tetapi metode ini mahal dan menyebabkan kandungan protein dalam kedelai menjadi rusak. Salah satu alternatif untuk mengurangi raffinosa dan stakhiosa dalam proses pembuatan susu kedelai dan yogurt dari susu kedelai adalah dengan menggunakan α -galaktosidase yang berasal dari mikroba (Cruz, R., 1981).

Penggunaan α -galaktosidase dibatasi oleh buruknya stabilitas α -galaktosidase yang berasal dari bakteri mesofilik dan fungi. Sampai saat ini, α -galaktosidase yang termostabil dari *Bacillus stearothermophilus* (Fridjonsson, O., 1999), *Thermus brockianus* ITI360 (Fridjonsson, O., 1999), *Thermotoga neapolitana* (King, M.R., 1998) dan *Thermotoga maritima* (Liebl, W., 1998) telah diklon dan diekspresikan.

Bacillus sp. umumnya tidak dapat tumbuh pada kondisi pH netral, tetapi dapat tumbuh dengan baik pada pH lebih besar dari 9,5. *Bacillus sp.* menghasilkan banyak enzim alkalofilik, seperti protease, amilase, cellulase dan pullulanase. Enzim alkali ini banyak digunakan sebagai produk komersial (Horikoshi, K., 1999). Oleh karena itu, *Bacillus sp.* adalah mikroba yang cukup penting tidak hanya dalam dunia akademi, tetapi juga dalam dunia industri (Takami, H., 2000).

Bacillus halodurans C-125 diisolasi pada tahun 1977 dan diketahui sebagai penghasil β -galaktosidase (Ikura, Y., 1979) dan xilanase (Honda, H., 1985). *B. halodurans* adalah bakteri haloalkalifilik yang dapat tumbuh pada kisaran pH 6,8 – 10,8. *B. halodurans* dan *B. subtilis* adalah *strain* yang paling banyak dikarakterisasi baik dari sisi fisiologi, biokimia, maupun genetika. Bakteri ini menghasilkan enzim-enzim yang penting bagi dunia industri, seperti protease, pektinase, amilase, dan xilanase. Enzim yang dihasilkan oleh *B. halodurans* memiliki suhu optimal yang tinggi (50-70° C) dan pH optimal pada kisaran pH alkali (Takami, H., 2000).

Sekuen gen *B. halodurans* telah diketahui (Takami, H., 2000). Berdasar sekuennya, terdapat tiga buah gen α -galaktosidase pada *B. halodurans*; BH2228 yang merupakan famili 4 glikosida hidrolase, BH1870 dari famili 27 dan BH2223 dari famili 36 (Henrissat, B., <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>).

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimen sebagai berikut:

1. Purifikasi protein

Plasmid pET28-Aga27 diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya (Anggraeni, A.A., 2008). *E. coli* BL21(DE3) yang mengandung pET28-Aga27 digunakan sebagai sumber protein rekombinan. Rekombinan *E. coli* tersebut ditumbuhkan pada 500 mL media LB yang mengandung 50 μ g/ml kanamycin pada suhu 37° C sampai mencapai nilai $OD_{600} = 0,6$. Rekombinan protein diinduksi dengan menggunakan IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). 1 mM IPTG ditambahkan ke dalam media dan inkubasi dilanjutkan selama 4 jam pada suhu 37° C.

Sel didapatkan dengan cara centrifugasi pada 4,000xg selama 20 menit. Sel tersebut dilarutkan dalam 30 mL buffer lysis (pH 8) yang mengandung 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl dan 10 mM imidazole. Sel diluruhkan dengan menggunakan sonikasi dan dinding sel dipisahkan dengan menggunakan sentrifugasi pada 12,000 x g selama 25 min. Supernatan yang diperoleh kemudian digunakan sebagai crude enzyme solution.

Protein rekombinan didesain untuk memiliki His-tag pada N-terminal. Oleh karena itu, purifikasi dilakukan dalam satu langkah

dengan *metal-affinity chromatography* menggunakan kolom HiTrap Chelating HP. Kolom tersebut diekuilibrasi dengan menggunakan buffer fosfat (pH 7,4) yang mengandung 500 mM NaCl dan 10 mM imidazole. Protein yang teradsorpsi dielusi dengan menggunakan imidazole (100-500 mM) pada buffer yang sama. Kemurnian setiap fraksi protein dianalisa dengan menggunakan SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

2. Uji aktivitas protein

Protein yang telah dipurifikasi ditambahkan ke dalam larutan 0,03% guar gum. Kemudian larutan ini dimasukkan ke dalam viskosimeter. Reaksi enzimatik dilakukan di dalam water-bath. Eksperimen ini dilakukan pada suhu 37, 45, 55 dan 65° C. Kekentalan produk reaksi enzimatik diukur setiap interval 10 menit. Eksperimen dihentikan apabila sudah tidak terjadi perubahan kekentalan larutan yang signifikan.

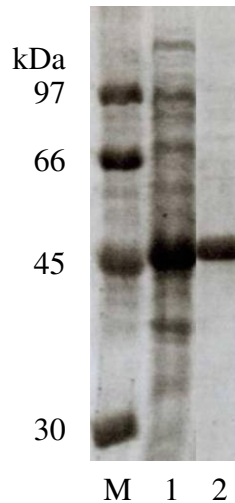
Hasil Penelitian

1. Purifikasi Protein

Protein rekombinan diekspresi dalam media LB yang telah diinokulasi dengan *E. coli* BL21(DE3) yang mengandung plamid pET28-BH1870. Purifikasi protein dilakukan dengan menggunakan HP

Efek Penambahan α -Galaktosidase Famili 27 Glikosida Hidrolase *Bacillus Halodurans* Terhadap Kekentalan Guar Gum (Andian Ari Anggraeni)

Chelating Column (Amersham) chromatography. Analisa SDS-PAGE menunjukkan bahwa berat molekul protein adalah 50 kDa (Gambar 1).



Gambar 1. Analisa SDS-PAGE pada protein hasil purifikasi. Indeks M, protein molecular mass standard; indeks 1, crude extract; indeks 2, protein hasil purifikasi.

2. Aktivitas Protein

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa aktivitas enzim α -galaktosidase tidak terdeteksi oleh metode DNS dan Somogyi-Nelson (Anggraeni, A.A., 2008). Oleh karena itu, aktivitas

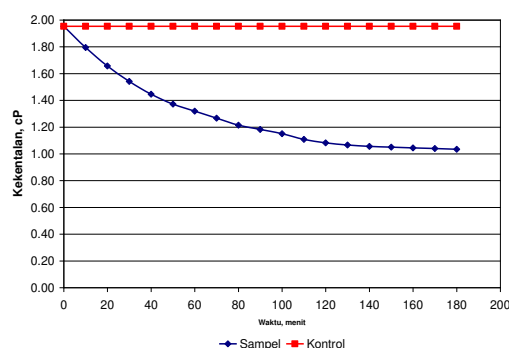
protein dipelajari dengan menggunakan metode pengukuran viskositas larutan substrat guar gum.

Protein yang telah dipurifikasi ditambahkan ke dalam larutan 0,03% guar gum. Kemudian larutan ini dimasukkan ke dalam viskosimeter. Reaksi enzimatis dilakukan di dalam water-bath pada suhu 37° C. Sebagai kontrol, digunakan larutan 0,03% guar gum yang tidak ditambah dengan protein hasil purifikasi. Kekentalan produk reaksi enzimatis diukur setiap interval 10 menit. Eksperimen dihentikan apabila sudah tidak terjadi perubahan kekentalan larutan yang signifikan. Pengaruh penambahan enzim terhadap kekentalan larutan guar gum 0,03% dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil pengukuran kekentalan larutan kontrol menunjukkan tidak adanya perubahan kekentalan larutan selama 3 jam eksperimen. Sementara itu, kekentalan larutan sampel terus menurun selama kurun waktu 3 jam.

Eksperimen ini juga dilakukan pada suhu 45, 55 dan 65 °C. Pada suhu tersebut, kekentalan larutan sampel relatif tidak berubah dibanding dengan kontrol.

Efek Penambahan α -Galaktosidase Famili 27 Glikosida Hidrolase *Bacillus Halodurans* Terhadap Kekentalan Guar Gum (Andian Ari Anggraeni)



Gambar 2. Pengukuran kekentalan larutan guar gum 0,03% pada suhu 37 °C. Sampel adalah larutan guar gum 0,03% dengan penambahan protein hasil purifikasi. Sedangkan kontrol adalah larutan guar gum 0,03%.

Hasil dan Pembahasan

1. Aktivitas protein

Plasmid pET28-BH1870 diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya (Anggraeni, A.A., 2008). *E. coli* BL21 (DE3) yang mengandung plasmid pET28-BH1870 digunakan sebagai sumber protein rekombinan. Hasil analisa SDS-PAGE pada protein hasil purifikasi menunjukkan berat molekul protein sebesar 50 kDa. Hasil ini sesuai dengan hasil prediksi perhitungan berat molekul.

Penambahan protein hasil purifikasi ke dalam larutan guar gum 0,03% menyebabkan penurunan kekentalan larutan. Hal ini

menunjukkan bahwa protein yang ditambahkan ke dalam larutan 0,03% guar gum mempunyai aktivitas sebagai α -galaktosidase. Penambahan enzim α -galaktosidase ke dalam larutan guar gum akan menurunkan kekentalan larutan gur gum.

Pada suhu 45, 55 dan 65 °C, enzim α -galaktosidase mengalami degradasi sehingga kehilangan aktivitasnya. Oleh karena itu, kekentalan larutan sampel dan larutan kontrol pada suhu tersebut tidak menunjukkan perubahan yang berarti. Hal ini menunjukkan bahwa enzim ini tidak stabil pada suhu tinggi.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa enzim ini tidak menunjukkan aktivitas pada substrat pNP- α -galactopyranoside, melibiosa, raffinosa maupun guar gum dengan uji aktivitas menggunakan metode DNS maupun metode Somogyi-Nelson (Anggraeni, A.A., 2008). Metode DNS digunakan untuk mendeteksi enzim yang mempunyai aktivitas besar sedang metode Somogyi-Nelson dapat digunakan untuk mendeteksi enzim yang aktivitasnya lebih kecil. Metode pengukuran kekentalan larutan guar gum dapat digunakan untuk mendeteksi aktivitas enzim yang sangat kecil. Enzim hasil purifikasi ini dapat digolongkan dalam enzim yang aktivitasnya rendah, karena tidak bisa terdeteksi dengan metode DNS dan Somogyi-Nelson.

2. Conserved catalytic residue

Famili 27 glikosida hidrolase terdiri dari beberapa jenis enzim seperti α -galaktosidase, N-acetyl- α -galaktosidase dan isomalto-dextranase. Beberapa tahun yang lalu, struktur kristal dari N-acetyl- α -galaktosidase dan tiga buah α -galaktosidase dari padi, manusia dan *Trichoderma reesei* telah ditemukan. Dua buah catalytic residue, yaitu Asp-132 dan Asp-226 (penomoran berdasar pada *T. reesei*), juga ditemukan pada semua enzim anggota famili 27 glikosida hidrolase, termasuk pada *B. halodurans*.

Selain *catalytic residue*, beberapa asam amino dalam enzim famili 27 membentuk kontak hidrofilik dan hidrofobik dengan ligan. Sepuluh buah asam amino yang membentuk kontak dengan ligan adalah Trp-19, Asp-54, Asp-55, Cys-104, Lys-130, Asp-132, Cys-203, Trp-205, Arg-222, and Asp-226 (penomoran berdasar pada *T. reesei*). Hampir semua asam amino ini terdapat pada α -galaktosidase famili 27 glikosida hidrolase.

Site-directed mutagenesis pada α -galaktosidase famili 36 dari *Bifidobacterium adolescentis* menunjukkan bahwa mutasi Asp-381 (atau Asp-55 pada *T. reesei*) mengakibatkan hilangnya aktivitas hidrolisis (Hinz, S.W.A., 2005). Famili 27 dan famili 36 glikosida hidrolase mempunyai mekanisme katalitik yang serupa sehingga dapat digolongkan ke dalam klan D. Residu asam aspartat ini

terdapat pada semua α -galaktosidase famili 27. Tetapi pada *B. halodurans*, posisi residu asam aspartat ini digantikan oleh isoleucine (Gambar 3).

Struktur kristal *T. reesei* α -galaktosidase menunjukkan jembatan disulfide antara Cys-104 dan Cys-134 (Golubev, A.M., 2004). Pada *B. halodurans*, hanya ditemukan satu buah cysteine, Cys-145 (Cys-104 pada *T. reesei*), sedangkan cysteine yang lain digantikan posisinya oleh isoleucine (Gambar 4).

Residu asam amino yang dianggap penting untuk aktivitas α -galaktosidase famili 27 juga terdapat pada α -acetylgalaktosaminidase (α -NAGA) yang berasal dari ayam. Struktur kristal dari α -NAGA ayam telah ditemukan. Residu asam amino yang dianggap penting untuk berikatan dengan ligan adalah Tyr-103 and Asp-236 (Garman, S.C., 2002). Kedua asam amino ini terdapat pada α -galaktosidase famili 27. Meskipun demikian, pada *B. halodurans*, posisi tyrosine digantikan oleh histidine (Gambar 4).

Efek Penambahan α -Galaktosidase Famili 27 Glikosida Hidrolase *Bacillus Halodurans* Terhadap Kekentalan Guar Gum (Andian Ari Anggraeni)

AGA_CLOJO	YKYVNLDDNUMAN--PAR-----	DANGKLIPDPKRFPP-----	SGMKALADYIHSK	120
GAL27A_CCEL	YVYVNLDDNUMAN--PAR-----	DSNGNLRADPTTRFP-----	SGIRALADYVHAK	114
AGAL_COFAR	YKYINLDDCWAEE--LNR-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	101
GALA_COFAR	YKYINLDDCWAEE--LNR-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	143
GALA_COCAN	YKYINLDDCWAEE--LNR-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	101
AGAL_SOYBN	YQYINLDDCWGE--LNR-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGMKALADYVHSH	145
AGAL_CYATE	YQYINLDDCWAEE--LNR-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	133
AGA_CUSAT	YQYINLDDCWAEE--LNR-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	145
AGAL_SOLCC	YKYINLDDCWAEE--LNR-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	131
AGAL_ORISA	YQYVNLDDCWAEE--YER-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	141
MELA_SACER	YQYVNLDDCWAEE--YER-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIRALADYVHSH	124
AGAB2_SAVER	YQYVNLDDCWAEE--YER-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	140
AGAB27A_CMIX	YKYINLDDCWGE--LNR-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGMKALADYVHSH	110
AGAA1_SAVER	YQYVNLDDCWAEE--YER-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	124
AGAA2_SAVER	YQYVNLDDCWAEE--YER-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	133
AGLB_ASPNG	YKYINLDDCWAEE--LNR-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	106
AGAL_PENPU	YQYVNLDDCWAEE--YER-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	109
AGA_TRESEI	YQYVNLDDCWAEE--YER-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	69
AGA_ZYGO	YQYVNLDDCWAEE--YER-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	106
MEL1_YEAST	YQYVNLDDCWAEE--YER-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	106
AGLA_ASPNG	YQYVNLDDCWAEE--YER-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	119
AGAL_HUMAN	YQYVNLDDCWAEE--YER-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGIKALADYVHSH	127
BH1870	YKYVNLDDCWAEE--LNR-----	DSQGNLVPGSTTFP-----	SGMKALADYVHSH	105



Gambar 3. Asam amino nomor 46 sampai dengan 105 pada *B. halodurans* BH1870 dan beberapa α -galaktosidase famili 27. Tanda panah menunjukkan residu asam amino yang terdapat pada semua α -galaktosidase famili 27 tetapi tidak terdapat pada *B. halodurans* BH1870. Singkatan yang digunakan adalah sebagai berikut: CLOJO, *Clostridium josui*; CCEL, *Clostridium cellulolyticum*; COFAR, *Coffea arabica*; COCAN, *Coffea canephora*; SOYBN, *Glycine max* (soybean); CYATE, *Cyamopsis tetragonoloba*; CUSAT, *Cucumis sativus*; SOLCC, *Solanum lycopersicum*; ORISA, *Oryza sativa*; SACER, *Saccharopolyspora erythraea*; SAVER, *Streptomyces avermitilis*; CMIX, *Celvibrio mixtus*; ASPNG, *Aspergillus niger*; PENPU, *Penicillium purporogenum*; TRESEI, *Trichoderma reesei*; ZYGO, *Mortierella vinacea*; YEAST, *Saccharomyces cerevisiae*; HUMAN, *Homo sapiens*.


```

AGA_CLOJO      GLKFGIYDGRGV-----TTCNIP-----QSGSQGYE 147
GAL27A_CCEL    GLKLGIVYGGROT-----MTCNIP-----QSGSQGYE 141
AGAL_COFAR     GLKLGIVSDAGT-----QTCCKT-----MPGSLGHE 127
GALA_COFAR     GLKLGIVSDAGT-----QTCCKT-----MPGSLGHE 169
GALA_COCAN     GLKLGIVSDAGT-----QTCCKT-----MPGSLGHE 127
AGAL_SOYBN     GLKLGIVSDAGN-----QTCCKT-----MPGSLGHE 171
AGAL_CYATE     GLKLGIVSDAGN-----QTCCKT-----MPGSLGHE 159
AGA_CUSAT      GLKLGIVSDAGI-----RTCSKR-----MPGSLGHE 171
AGAL_SOLCC     GLKLGIVSDAGT-----QTCCKT-----MPGSLGHE 157
AGAL_ORISA     GLKLGIVSDAGS-----QTCCKT-----MPGSLDHE 167
MELA_SACER     GLKFGIYQVPT-----KTCAGRGGT---YPGATGSLGHE 156
AGAB2_SAVER    GLKLGIVTSAGT-----KTCNEAG---FP---GALGHE 167
AGAB27A_CMIX   GLKLGIVSDAGN-----TTCAGRP-----GSLGHE 135
AGAA1_SAVER    GLKLGIVSDAGT-----ATCQGYG-----GSLGHE 149
AGAA2_SAVER    GLKAGIYTDAGK-----DGCYVYPTGRPAAPGSGEGHY 168
AGLB_ASPNG     GLKLGIVSDAGL-----TTCAGYP-----ASLGYE 131
AGAL_PENPU     GLKLGIVSDAGY-----ETCAGYP-----ASLGYE 134
AGA_TRESEI     GLKLGIVSTAGT-----ATCAGYP-----ASLGYE 114
AGA_ZYGO       GLKVGIVSSAGT-----LTCGGHI-----ASLGYE 131
MEL1_YEAST     SFLPQIVSSAGE-----YTCAGYP-----GSLGHE 131
AGLA_ASPNG     GFHFGIVSDSGN-----MTCGGYP-----GSYNHE 144
AGAL_HUMAN     GLKLGIVADVGN-----KTCAGFP-----GSFGYY 152
BH1870         GLKFGIHIRGIPRQAVYENSPVLGSKTKTAREIAHTNSICPWNTDMYGVDPTRKGAQSY 165

```



Gambar 4. Asam amino nomor 106 sampai dengan 186 pada *B. halodurans* BH1870 dan beberapa α -galaktosidase famili 27. Tanda panah menunjukkan residu asam amino yang terdapat pada semua α -galaktosidase famili 27 tetapi tidak terdapat pada *B. halodurans* BH1870.

```

AGA_CLOJO      EQDAKTFAEWGLDYLKYDNC-----167
GAL27A_CCEL    DKDAKTFASUGIDYLKYDNCNI-----163
AGAL_COFAR     EQDAKTFASUGVDYLKYDNCN-----148
GALA_COFAR     EQDAKTFASUGVDYLKYDNCN-----148
GALA_COCAN     EQDAKTFASUGVDYLKYDNCN-----192
AGAL_SOYBN     EQDAKTFASUGVDYLKYDNCN-----180
AGAL_CYATE     EQDAKTFASUGVDYLKYDNCN-----192
AGA_CUSAT      EQDAKTFASUGVDYLKYDNCN-----178
AGAL_SOLCC     EQDAKTFASUGVDYLKYDNCN-----188
AGAL_ORISA     EQDAKTFAEWGLDYLKYDNCN-----177
MELA_SACER     YSDAQQFADWGVVDYLKYDNCN-----188
AGAB2_SAVER    YQDAVTYASUGIDYVVKYDNCN-----156
AGAB27A_CMIX   QTDADSFASUGVDYLKYDNCN-----170
AGAA1_SAVER    DQDMLQFSTWGFDFVKVDWCGG-----190
AGAA2_SAVER    EIDAQSFAEWGLDYLKYDNCVPTNLTDQYTYCVPDSTDGSNYPNGTCVNLTD-----APQG 189
AGLB_ASPNG     TIDAQTFAEWGLDYLKYDNCNYPSEWDDYNAICLPDSYVGVNPNGTCPGLTNP-----APAG 192
AGAL_PENPU     DVDAADFADWGVVDYLKYDNCNYPSEWDDYNAICLPDSYVGVNPNGTCPGLTNP-----APAG 192
AGA_TRESEI     EIDAQTFASUGMDYLKYDNCYN-----QG 155
AGA_ZYGO       EEDAQFFANNRVDYLKYDNCYN-----KG 155
MEL1_YEAST     EQDANTFASUGIDYLKLDGCVNYATQG-----171
AGLA_ASPNG     DIDAQTFADWGVDDLKFDGCVY-----173
AGAL_HUMAN     NSLFELYAQWGVDFVKVDDIA-----186
BH1870

```



Gambar 4. Asam amino nomor 106 sampai dengan 186 pada *B. halodurans* BH1870 dan beberapa α -galaktosidase famili 27. Tanda panah menunjukkan residu asam amino yang terdapat pada semua α -galaktosidase famili 27 tetapi tidak terdapat pada *B. halodurans* BH1870.

Beberapa residu yang dianggap penting bagi aktivitas enzim famili 27 ternyata tidak terdapat pada *B. halodurans* BH1870. Ketiadaan residu-residu ini mungkin berpengaruh pada aktivitas protein hasil purifikasi yang digunakan pada penelitian ini. Untuk membuktikan asumsi ini, diperlukan studi lanjut tentang *site-directed mutagenesis* pada residu-residu ini.

3. Aplikasi dalam industri pangan

Enzim α -galaktosidase mempunyai nilai penting dalam bioteknologi. α -Galaktosidase telah digunakan dalam industri pangan, yaitu industri gula dan susu kedelai. Senyawa yang mengandung α -1,6-galaktosa terdapat pada kacang-kacangan, tebu dan sayuran. Manusia kekurangan enzim α -galaktosida dalam sistem pencernaannya. Oleh karena itu, bahan makanan yang mengandung α -1,6-galaktosa tidak dapat dicerna oleh usus. Senyawa ini kemudian didegradasi oleh bakteri dalam usus sehingga menghasilkan gas yang menyebabkan perut menjadi kembung. Kedelai banyak mengandung senyawa α -1,6-galaktosid seperti raffinosa dan stakhiosa. Karena senyawa ini tidak dapat dicerna oleh usus, kedelai diberi perlakuan enzimatis dengan penambahan enzim α -galaktosidase. α -Galaktosidase akan mendekomposisi raffinosa dan stakhiosa menjadi D-galaktosa yang bisa dicerna oleh usus manusia.

Penggunaan α -galaktosidase dalam industri gula dan susu kedelai membutuhkan suhu tinggi, oleh karena itu dibutuhkan α -galaktosidase yang stabil pada suhu tinggi. Penggunaan α -galaktosidase dalam dunia industri dibatasi oleh kestabilan enzim dalam suhu tinggi. Sampai saat ini, beberapa enzim α -galaktosidase yang termostabil sudah berhasil ditemukan. *B. halodurans* diketahui sebagai sumber dari beberapa enzim yang stabil pada suhu tinggi, sehingga protein hasil transkripsi gen α -galaktosidase dari *B. halodurans* diharapkan untuk memiliki stabilitas pada suhu tinggi.

Namun, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa α -galaktosidase dari *B. halodurans* famili 27 adalah enzim yang tidak stabil pada suhu yang lebih besar dari 37 °C. Beberapa residu asam amino yang dianggap penting bagi aktivitas hidrolisis enzim famili 27 ternyata tidak terdapat pada *B. halodurans* α -galaktosidase. Ketiadaan residu ini mungkin dapat mempengaruhi kestabilan enzim pada suhu tinggi. Untuk membuktikan asumsi ini, diperlukan studi lanjut tentang *site-directed mutagenesis* pada residu-residu ini.

Simpulan

Protein rekombinan hasil ekspresi gen α -galaktosidase dari *B. halodurans* famili 27 glikosida hidrolase mempunyai aktifitas sebagai

enzim α -galaktosidase pada substrat guar gum. Namun, enzim ini tidak stabil pada suhu yang lebih besar dari 37°C. Beberapa residu asam amino yang dianggap penting bagi aktivitas hidrolisis enzim famili 27 ternyata tidak terdapat pada *B. halodurans* α -galaktosidase. Ketiadaan residu ini mungkin dapat mempengaruhi kestabilan enzim pada suhu tinggi. Untuk membuktikan asumsi ini, diperlukan studi lanjut tentang *site-directed mutagenesis* pada residu-residu ini.

Daftar Pustaka

- Anggraeni, A.A., Sakka M., Kimura, T., Ratanakhaokchai, K., Kitaoka, M., dan Sakka, K. 2008. Characterization of *Bacillus halodurans* α -galactosidase Mel4A encoded by the *mel4A* Gene (BH2228). Biosci. Biotech. Biochem. 72:2459-2462
- Baik, S.H., Saito, K., Yokota, A., Asano, K. dan Tomita, F. 2000. Molecular cloning and high-level expression in *Escherichia coli* of fungal α -galactosidase from *Absidia corymbifera* IFO 8084. J. Biosci. Bioeng. 90:168-173
- Bishop, D.F., Calhoun, D.H., Bernstein, H.S., Hantzopoulos, P., Quinn, M. dan Desnick, R.J. 1986. Human α -galactosidase A: Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the mature enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:4859-4863
- Calloway, D., Hickey, C. dan Murphy, E. 1971. Reduction of intestinal gas-forming properties of legumes by traditional and experimental food processing methods. J. Food. Sci. 36:251-255

- Cruz, R., Batistela, J. dan Wosiacki, G. 1981. Microbial α -galactosidase for soy milk processing. J. Food Sci. 46:1196-1200
- Dey, P.M. dan Campillo, E.D. 1984. α -Galactosidase. Advance Enzymology Relation Areas. Mol. Biol. 56:142-249
- Fridjonsson, O., Watzlawick, H., Gehweiler, A. dan Mattes, R. 1999. Thermostable α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* NUB3621: Cloning, sequencing and characterization. FEMS Microbiol. Lett. 176:147-153
- Fridjonsson, O., Watzlawick, H., Gehweiler, A., Rohrhirsch, T. dan Mattes, R. 1999. Cloning of the gene encoding a novel thermostable α -galactosidase from *Thermus brockianus* ITI360. Appl. Environ. Microbiol. 65:3955-3963
- Garman, S.C., Hannick, L., Zhu, A. and Garboczi, D.N. 2002. The 1.9 Å structure of N-acetylgalactosaminidase: molecular basis of glycosidase deficiency diseases. Structure. 10:425-434
- Goldstein, A. M., Alter, E. N. dan Seaman, J. K. 1973. Guar gum, p. 303-321. In R. Whistler and J.M. BeMiller (ed.), *Industrial Gums*. Academic Press, New York.
- Golubev, A.M., Nagem, R.A.P., Brandao Neto, J.R., Neustroev, K.N., Eneyskaya, E.V., Kulinskaya, A.A., Shabalin, K.A., Savel'ev, A.N. and Polikarpov, I. 2004. Crystal structure of α -galactosidase from *Trichoderma reesei* and its complex with galactose: Implications for catalytic mechanism. J. Mol. Biol. 339:413-422
- Henrissat, B. dan Bairoch, A. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. Biochem. J. 316:695-696
- Henrissat, B. dan Coutinho, P. Glycosyl hydrolase families. Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, NRS,

Marseille, France, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>

- Hinz, S.W.A., Doeswijk-Voragen, C.H.L., Schipperus, R., van den Broek, L.A.M., Vincken, J.P. and Voragen, A.G.J. 2005. Increasing the transglycosylation activity of α -galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 by site-directed mutagenesis. *Biotechnol. Bioeng.* 93:122-31
- Honda, H., Kudo, T., Ikura, Y. dan Horikoshi, K. 1985. Two types of xylanases of alkalophilic *Bacillus* sp. No C-125. *Can. J. Microbiol.* 31:538-542
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:735-750
- Ikura, Y. dan Horikoshi, K. 1979. Isolation and some properties of β -galactosidase-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* 43:85-88
- Jindou, S., Karita, S., Fujino, E., Fujino, T., Hayashi, H., Kimura, T., Sakka, K. dan Ohmiya K. 2001. α -Galactosidase Aga27A, an enzymatic component of the *Clostridium josui* cellulosome. *J. Bacteriol.* 184:600-604
- Kim, W.D., Kaneko, S., Park, G.G., Tanaka, H., Kusakabe, I. dan Kobayashi, H. 2003. Purification and characterization of α -galactosidase from sunflower seeds. *Biotechnol. Lett.* 25:353-358
- King, M.R., Yernool, D.A., Eveleigh, D.E. dan Chassy B.M. 1998. Thermostable α -galactosidase from *Thermotoga neapolitana*: Cloning, sequencing and expression. *FEMS Microbiol. Lett.* 163:37-42
- Liebl, W., Wagner, B. dan Schellhase, J. 1998. Properties of an α -galactosidase, and structure of its gene *gala*, within an α -

and β -galactosidase utilization gene cluster of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. Syst. Appl. Microbiol. 21:1-11

Ohshima, T., Murray, G.J., Nagle, J.W., Quirk, J.M., Kraus, M.H., Barton, N.W., Brady, R.O. dan Kulkarni, A.B. 1995. Structural organization and expression of the mouse gene encoding α -galactosidase A. Gene 166:277-80

Post, D.A. dan Luebke, V.E. 2005. Purification, cloning, and properties of α -galactosidase from *Saccharopolyspora erythraea* and its use as a reporter system. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67:91-96

Takami, H. dan Horikoshi, K. 2000. Analysis of the genome of an alkaliphilic *Bacillus* strain from an industrial point of view. Extremophiles 4:99-108

Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hiram, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S. dan Horikoshi K. 2000. Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. 28:4317-4331

Turakainen, H., Korhola, M. dan Aho, S. 1991. Cloning, sequence and chromosomal location of a MEL gene from *Saccharomyces carlsbergensis* NCYC396. Gene 101:97-104

Yamane, T. 1971. Decomposition of raffinose by α -galactosidase. An enzymatic reaction applied in the factory-process in Japanese beet sugar factories. Sucr. Belge/Sugar Ind. Abstr. 90:345-348