

# PERKIRAAN MASSA MOLEKUL ENZIM PENDEGRADASI INULIN DARI BAKTERI TERMOFILIK *Bacillus licheniformis* DAN AKTIVITAS ENZIM PADA GRANULA INULIN

Minda Azhar<sup>1</sup>, Sumaryati Syukur<sup>2</sup>, Dessy Natalia<sup>3</sup>, Vovien<sup>4</sup>, Jamsari<sup>4</sup>

<sup>1.</sup> Laboratorium Biokimia, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Padang, Jl. Prof. Dr. Hamka, Air Tawar, Padang.

<sup>2.</sup> Laboratorium Biokimia, Fakultas MIPA, Universitas Andalas, Padang

<sup>3.</sup> Kelompok Riset Biokimia, Fakultas MIPA, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesha 10, Bandung

<sup>4.</sup> Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang

E-mail : minda@fmipa.unp.ac.id

## ABSTRACT

*Inulin degrading enzymes from thermophilic bacteria is potential developed in food industry to produce fructose and fructo-oligosaccharides (FOS) prebiotics. In this study, inulin degrading enzymes from thermophilic bacterium Bacillus licheniformis was purified partially by ammonium sulfate. Molecular mass of inulin degrading enzymes was determined on 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Molecular mass of inulin degrading enzymes from Bacillus licheniformis was predicted 57.2 kDa. The enzymes activity was conducted on inulin granula from chicory. The enzyme was active on inulin granula. B-sandwich domain of the enzymes was thought to degrade inulin granula which is insoluble polysaccharides.*

**Keywords;** *Bacillus Licheniformis, Enzim Pendegradasi Inulin, Inulinase, SDS-PAGE, GH32*

---

## PENDAHULUAN

Enzim pengdegradasi inulin dari bakteri termofilik merupakan enzim yang potensial dikembangkan untuk mem produksi fruktosa dan *fructo-oligosaccharides* (FOS). Fruktosa dan FOS merupakan senyawa yang sangat penting pada industri makanan, minuman, dan farmasi (Tohamy, 2006; Sirisansaneeyakul *et al.*, 2007; Singh, 2006). Fruktosa merupakan pemanis alami yang aman dibanding sukrosa karena mempunyai efek yang bermanfaat pada pasien diabetes, menaikkan penyerapan zat besi pada anak-anak dan mempunyai kapasitas manis yang lebih tinggi (Singh, 2006). FOS merupakan *functional food* karena mempunyai pengaruh positif terhadap komposisi mikroflora usus manusia (Roberfroid *et al.*, 1998; Kaplan, 2003). Oleh sebab itu, FOS lebih dikenal sebagai prebiotik.

Pembuatan fruktosa dari inulin jauh lebih efektif dan efisien dibandingkan dari pati. Pembuatan fruktosa dari pati melibatkan tiga enzim, yaitu amilolisis pati dengan katalis  $\alpha$ -amilase dan amiloglukosidase, diikuti dengan pengubahan glukosa ke fruktosa yang dikatalisis oleh glukosa isomerase. Proses ini menghasilkan maksimal hanya sekitar 42% fruktosa, sisanya 50% glukosa dan 8% oligosakarida (Zittan, 1981). Teknik *ion exchange* telah dikembangkan untuk memperkaya fruktosa, tetapi hanya menambah ongkos produksi. Oleh sebab itu, enzim yang terlibat pada reaksi hidrolisis inulin adalah pilihan yang paling tepat. Enzim tersebut adalah inulinase dan levanase.

Fruktosa dan prebiotik FOS lebih efektif dan efisien diperoleh dari inulin menggunakan inulinase atau levanase sebagai katalis. Inulinase dan levanase termasuk kelompok enzim famili *glycoside hydrolase* (GH)32. Inulinase dan levanase aktif pada substrat fruktan terutama inulin dan levan. Inulinase dari *Aspergillus awamori* dapat menghidrolisis inulin dan levan melalui aksi exo- melepaskan fruktosa (Arand *et al.*, 2002). Inulinase dari *Bacillus polymyxa* dapat menghidrolisis sukrosa, levan, raffinosa and inulin (Kwon *et al.*, 2003). Levanase dari *Bacillus subtilis* yang diekspresikan dalam *Escherichia coli* aktif pada levan, inulin and sukrosa (Wanker *et al.*, 1995), sedangkan exolevanase dari *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 dapat menghidrolisis levan, inulin, dan sukrosa (Menendez *et al.*, 2002).

Aksi endo- atau exo- dari levanase dan inulinase pada inulin menghasilkan produk yang berbeda. Produksi fruktosa dari inulin dapat digunakan exoinulinase atau exolevanase, sedangkan untuk memperoleh FOS dari inulin digunakan endoinulinase atau endolevanase. Kombinasi endo- dan exoinulinase mempunyai efek sinergik yang kuat. Hal ini telah dilaporkan oleh Sirisansaneeyakul *et al.* (2007) dengan mencampurkan inulinase dari *Aspergillus niger* dan *Candida guilliermondii* untuk memproduksi fruktosa dari inulin. Pada *Aspergillus niger* CBS 513.88 ditemukan inulinase yang mempunyai kedua tipe aksi ini (Yuan *et al.*, 2006). Dengan demikian campuran aktivitas endo- dan exoinulinase/levanase adalah lebih baik untuk hidrolisis inulin membentuk fruktosa, sedangkan aktivitas endoinulinase/endolevanase diperlukan jika produk yang diharapkan adalah prebiotik FOS.

Kelompok bakteri termofilik yang mengekspresikan inulinase atau levanase termostabil merupakan pilihan yang paling tepat sebagai katalis reaksi hidrolisis inulin untuk memperoleh fruktosa dan prebiotik

FOS. Hal ini karena inulin lebih larut dalam air pada suhu di atas 50°C (Phelps, 1965). Keuntungan lain penggunaan bakteri ini adalah enzim yang diekspresikan lebih mudah dimurnikan karena perlakuan panas, bersifat termostabil sehingga resisten terhadap denaturasi. Selain itu, reaksi enzimatik pada suhu tinggi memungkinkan kelarutan substrat lebih besar, menurunkan viskositas, memperkecil resiko kontaminasi dengan mikroorganisme lain dan kecepatan reaksi makin tinggi (Vieille, 2001).

Isolat bakteri yang berasal dari sumber air panas Bukik Kili telah diidentifikasi secara genotip dan fenotip (Azhar *et al.*, 2013). Pada paper ini, kami melaporkan massa molekul enzim pendegradasi inulin dari *Bacillus licheniformis* UBCT-007 dan aktivitas enzim pada granula inulin.

## METODE PENELITIAN

### Bakteri

Bakteri termofilik yang digunakan adalah *Bacillus licheniformis* UBCT-007 yang telah diidentifikasi secara fenotip dan genotip (Azhar *et al.*, 2013). Bakteri ini berasal dari sumber air panas Bukik Kili di Solok, Sumatera Barat.

### Ekstraksi Enzim Ekstraseluler

Isolat bakteri ditumbuhkan pada 100 mL media cair dengan inulin sebagai satu-satunya sumber karbon pada suhu 50°C, 150 rpm. Enzim ekstraseluler diisolasi dari kultur bakteri pada fase stasioner dengan sentrifugasi pada 10.000 g, suhu 4°C selama 20 menit. Komposisi media adalah (g/L); 2g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, 0,2g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1g trisodium sitrat, dan inulin (Castro *et al.*, 1995).

### Pemurnian Parsial Enzim

Garam ammonium sulfat yang telah dihaluskan ditambahkan perlahan-lahan ke dalam larutan enzim ekstraseluler pada

suhu 4°C sambil diaduk menggunakan pengaduk magnet hingga larut. Larutan dibiarkan selama 1 jam sambil tetap diaduk. Setelah 1 jam, larutan disentrifugasi dengan kecepatan 17.400 g pada suhu 4°C selama 45 menit. Supernatan dipisahkan dari endapan. Endapan dilarutkan dalam bufer asetat 25 mM pH5 dan disimpan sebagai fraksi ammonium sulfat 0-80% jenuh. Selanjutnya dilakukan dialisis menggunakan membran selopan pada suhu 4°C. Protein yang telah didialisis dijadikan sampel untuk menentukan massa molekul enzim pendegradasi inulin dengan SDS-PAGE.

#### **Penentuan Perkiraan Massa Molekul Enzim Pendegradasi Inulin dengan SDS-PAGE**

Perkiraan massa molekul enzim pendegradasi inulin ditentukan pada 10% *sodium dodecyl sulfate poliakrilamid gel electrophoresis* (SDS-PAGE) sesuai metode Laemmli (1970). Gel poliakrilamid terdiri dari dua yaitu *stacking gel* dan *separating gel*. *Stacking gel* terletak di atas *separating gel*. Konsentrasi poliakrilamid pada *stacking gel* adalah 5% (b/v), sedangkan pada *separating gel* adalah 10% (b/v). Komposisi *stacking gel* adalah 1450 µL ddH<sub>2</sub>O, 250 µL 40% bis-akrilamid, 250 µL Tris-Cl 1,5M pH 6,8, 20 µL SDS 10%, 20 µL APS 10%, 2 µL TEMED. Komposisi *separating gel* adalah 2346 µL ddH<sub>2</sub>O, 1250 µL 40% bis-akrilamid, 1300 µL Tris-Cl 1,5M pH 6,8, 50 µL SDS 10%, 50 µL APS 10%, 4 µL TEMED.

*Separating gel* dimasukkan ke dalam cetakan kaca sampai jarak 1,5 cm dari batas atas kaca, kemudian diberi air agar permukaan gel rata. Setelah gel mengalami polimerisasi sempurna, air di atas gel dibuang dan diganti dengan *stacking gel*. Sisir dipasang untuk pembentuk sumur pada *stacking gel*. *Stacking gel* dibiarkan sampai polimerisasi sempurna.

Sampel dicampur dengan *loading* bufer (50 mM bufer Tris-Cl pH 6,8, bromfenol biru 0,1% (b/v), dan 10% (v/v)

gliserol, 0,1% (b/v) SDS) dan dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit, kemudian didinginkan sampai suhu kamar dan disentrifugasi. Campuran tersebut di masukkan ke dalam sumur pada gel. Sebagai marker digunakan campuran protein yang diketahui massa molekulnya. Elektroforesis dilakukan selama 60 menit pada 150 volt dalam bufer yang mengandung 25 mM basa tris, 250 mM glisin dan 0,1% (b/v) SDS. Gel dilepas dari cetakan kaca.

Visualisasi protein pada gel poliakrilamid dilakukan dengan pewarnaan komasi biru brilian (*coomasie brilliant blue*). Gel direndam dalam larutan pewarna yang mengandung 0,25% (b/v) biru brilian R-250, 40% (v/v) methanol, 50% (v/v) air, dan 10% (v/v) asam asetat glasial. Pewarnaan dilakukan selama 2 hingga 4 jam pada suhu ruang menggunakan *belly dancer*. Setelah itu, gel direndam dalam larutan destaining (40% (v/v) methanol, 50% (v/v) air, dan 10% (v/v) asetat glasial) selama semalam pada suhu ruang menggunakan *belly dancer*. Pada gel transparan terlihat pita-pita protein.

#### **Penentuan Aktivitas Enzim pada Granula Inulin**

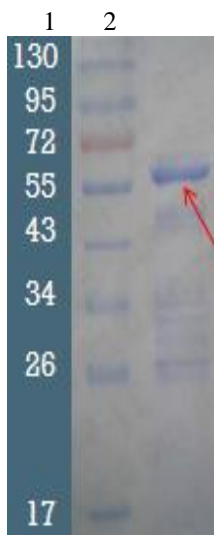
Aktivitas enzim pada granula inulin ditentukan dengan mengamati permukaan granula inulin akibat aktivitas enzim menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Campuran reaksi terdiri dari 500 µL 1% inulin *chicory* dalam bufer asetat pH 5 dan 500 µL enzim pendegradasi inulin. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37°C 150 rpm selama 24 jam. Campuran disentrifugasi 10.000g pada 4°C selama 5 menit. Setelah sentrifugasi pellet dicuci tiga kali dengan 95% etanol pa kemudian dikeringkan pada suhu 37°C selama 18 jam. Granula inulin yang telah diperlakukan dengan enzim selanjutnya dilapisi Emas-Paladium menggunakan Ion Sputer JFC-110 pada 1,2 KV dan 6 mA selama 4 menit. Butir inulin difoto menggunakan SEM (JSM-35C).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Perkiraan massa molekul enzim pendegradasi inulin

Enzim pendegradasi inulin dari *B. licheniformis* UBCT-007 dimurnikan secara parsial dengan pengendapan menggunakan garam ammonium sulfat pada fraksi 0-80% yang diikuti dialisis. Enzim pendegradasi inulin dari *B. licheniformis* UBCT-007 hasil dialisis dielektroforesis pada gel poliakrilamid SDS-PAGE. Hasil elektroforesis dimuat pada Gambar 1. Sebagai standar (marker protein) digunakan *prestained protein ladder* SM0671. Warna marker protein yang berukuran 72 kDa adalah merah, sedangkan marker protein berukuran 10 kDa adalah hijau. Marker protein yang lain berwarna biru.

Massa molekul enzim pendegradasi inulin dari *B.licheniformis* berdasarkan elektroforesis pada gel poliakrilamid SDS-PAGE diperkirakan adalah 57,2 kDa dengan harga persamaan garis  $y = 7,41 - 3,34 x$  pada  $r = 0,99$  ( $x$  adalah jarak migrasi protein pada gel poliakrilamid SDS-PAGE dan  $y$  adalah log massa molekul).



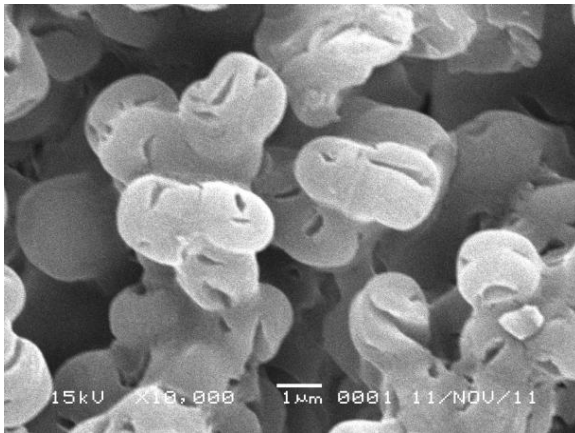
**Gambar 1.** SDS-PAGE enzim pendegradasi inulin dari *B. licheniformis* UBCT-007 . Lajur 1 adalah *marker* protein (kDa), lajur 2 adalah enzim pendegradasi inulin hasil pemurnian parsial dengan ammonium sulfat (tanda panah)

Massa molekul enzim pendegradasi inulin dari *Bacillus licheniformis* yang ditemukan pada riset ini berbeda dengan massa molekul enzim pendegradasi inulin dari bakteri lain. Exolevanase dari *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 memiliki massa molekul 58,4 kDa (Menendez *et al.*, 2002). Endoinulinase murni dari *Bacillus smithii* T7 ditemukan 47,5 kDa. Massa molekul exoinulinase dari *Bacillus polymyxa* adalah 55,52 kDa (Kwon *et al.*, 2003), sedangkan pada *Geobacillus stearothermophilus* KP1289 56,744 kDa (Tsujiimoto *et al.*, 2003). Perbedaan ini terutama disebabkan oleh perbedaan jumlah dan jenis residu asam amino penyusun molekul protein. Perbedaan tersebut akan mempengaruhi pergerakan molekul protein pada gel poliakrilamid SDS-PAGE.

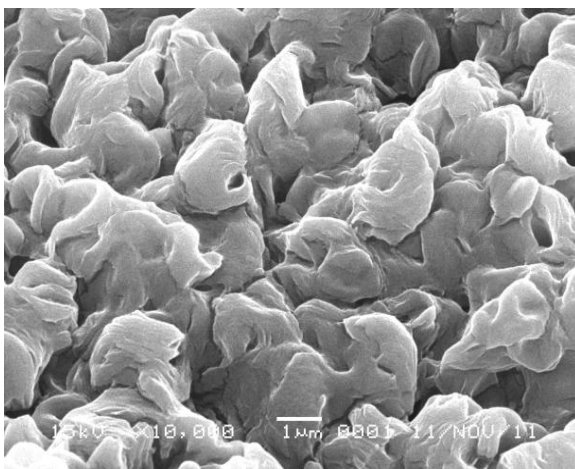
### Aktivitas Enzim Ekstraseluler pada Granula Inulin

Sejauh ini belum ditemukan publikasi tentang aktivitas inulinase /levanase pada granula inulin, tetapi aktivitas  $\alpha$ -amilase pada granula pati telah banyak dipelajari. Aktivitas  $\alpha$ -amilase pada granula pati dapat menunjukkan pola pengelupasan atau pembentukan pori pada permukaan granula pati. Perbedaan cara enzim menyerang granula pati berkaitan dengan morfologi dan kristalinitas granula pati (Buttrose, 1963).

Aktivitas enzim pendegradasi inulin pada granula inulin dipelajari menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Granula inulin yang digunakan adalah inulin dari *chicory*. Granula inulin sebelum perlakuan dengan enzim pendegradasi inulin berbentuk bulat oval yang antara satu granula dengan granula lain seperti bersambung. Pada permukaan granula terdapat beberapa celah panjang. Setelah perlakuan dengan enzim pendegradasi inulin, granula inulin tersebut tidak berbentuk oval lagi, pembentukan celah menjadi makin banyak (Gambar 2).



a



b

**Gambar 2.** Foto SEM Granula Inulin.

- a. Sebelum Perlakuan dengan Enzim Pendegradasi Inulin.
- b. Setelah Perlakuan dengan Enzim Pendegradasi Inulin

Inulinase dan levanase aktif pada substrat inulin. Struktur inulinase telah ditemukan pada *Protein Data Bank*, sedangkan struktur levanase belum ditemukan. Struktur exoinulinase dari *Aspergillus awamori* dilaporkan pada tahun 2004 (Nagem *et al.*, 2004), sedangkan struktur endoinulinase dari *Aspergillus ficuum* dipublikasi pada tahun 2012 (Pouyez *et al.*, 2012). Inulinase dan levanase termasuk keluarga enzim GH32. Secara keseluruhan struktur tersier GH32 melipat membentuk dua domain, yaitu  $\beta$ -

*propeller* pada domain N-terminal dan  $\beta$ -*sandwich* pada domain C-terminal. Pelipatan  $\beta$ -*sandwich* merupakan modul pengikat karbohidrat (*Carbohydrate Binding Module*, CBM) yang termasuk ke dalam 14 keluarga CBM yaitu CBM2, CBM3, CBM4, CBM6, CBM9, CBM15, CBM17, CBM22, CBM27, CBM28, CBM29, CBM32, CBM34 dan CBM36 (Boraston *et al.*, 2004).

Secara umum, fungsi CBM adalah mempromosikan hubungan enzim dengan substrat (Boraston *et al.*, 2004). Fungsi  $\beta$ -*sandwich* pada enzim keluarga GH32 belum diketahui (Goosen, 2007), mungkin terlibat dalam pengikatan fruktan (Verhaest *et al.*, 2005). Pada umumnya, CBM ditambahkan pada glikosida hidrolase yang mendegradasi polisakarida tidak larut (Boraston *et al.*, 2004). Dengan demikian, domain ini diperkirakan berperan untuk mendegradasi granula inulin yang merupakan polisakarida yang tidak larut.

## KESIMPULAN

Enzim pendegradasi inulin dari *Bacillus licheniformis* UBCT-007 diperkirakan mempunyai masa molekul 57,2 kDa. Aktivitas enzim ini pada granula inulin adalah merubah bentuk garnula menjadi tidak berbentuk oval, pembentukan celah menjadi makin banyak.

## Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional melalui Penelitian Hibah Doktor atas nama Minda Azhar, dengan nomor kontrak: 486/SP2H/PP /DP2M/VI/2010.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arand M, Golubev AM, Neto JRB, Polikarpov I, Wattiez R, Korneeva OS, Eneskaya EV, Kulminskaya AA, Shabalin KA, Shishliannkov SM, Chepunaya OV and, Neustroev, KN (2002). **Purification, Characterization, Gene Cloning and preliminary X-ray data of the exo-**

- inulinase from *Aspergillus awamori*.** *Biochem J*, 362:131-135.
- Azhar M, Syukur S, Natalia D, Vovien, Jamsari, Munaf E (2013) **Characterization of Extracellular Enzyme and Identification Of Inulin Degrading Bacteria From Hot Spring West Sumatra.** *International Journal of Chemistry*, vol 2(1):33-41
- Boraston AB, Bolam DN, Gilbert HJ, Davies GJ (2004). **Carbohydrate-binding modules: fine tuning polysaccharide recognition.** *Biochem. J*, 382 :769-781.
- Buttrose MS (1963). **Electron-microscopy of acid-degraded starch granules.** *Starch/Staerke*, 15:85-92
- Castro GR, Baigori MD, Sineriz, F (1995) **A plate technique for screening of inulin degrading microorganisms.** *Journal of Microbiological Methods*, 22:51-56.
- Goosen C (2007) **Identification and characterization of glycoside hydrolase family 32 enzymes from *Aspergillus niger*.** *PhD Thesis*. Rijksuniversitet Groningen
- Kaplan H, Hutkins, RW (2003). **Metabolism of fructooligo saccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195.** *Appl. Environ Microbiol.* 69:2217-2222.
- Kwon HJ, Jeon SJ, You DJ, Kim KH, Jeong YK, Kim YH, Kim YM, Kim BW (2003). **Cloning and characterization of exoinulinase from *Bacillus polymyxa*.** *Biotechnology Letter*, 25:155-159.
- Laemmli UK (1970) **Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, 227:680-685.
- Menendez C, Hernandez L, Selman G, Mendoza, M.F, Hevia P, Sotolongo M, Arrieta J.G (2002) **Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of an exo-lavanase gene from the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4.** *Current Microbiology*, 45:5-12
- Nagem RAP, Rojas A.L, Golubev AM, Korneeva O.S (2004). **Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinant of substrate recognition.** *J.Mol.Biol*, 344:471-480.
- Phelps CF (1965). **The physical properties of inulin solution.** *Biochem.J*, 95:41-47.
- Pouyez J, Mayard A, Vandamme AM, Roussel G, Perpete, EA, Wouters J, Housen I, Michaux C (2012). **First crystal structure of an endo-inulinase, INU2, from *Aspergillus ficuum*: discovery of an extra-pocket in the catalytic responsible for its endo-activity.** *Biochimie.* 94:2423-2430.
- Roberfroid, MB, Loo AEV, Gibson GR (1998). **The bifidogenic nature of chicory inulin and Its hydrolysis products.** *J. Nutr*, 126:11-19.
- Singh P, Gill PK (2006). **Production of inulinase: recent advances.** *Food Technol Biotechnol*, 44:151-162.
- Sirisansaneeyakul S, Worawuthiyanan N, Vanichsriratana W, Srinophakum P, Chisti Y (2007). **Production of fructose from inulin mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*.** *World J Microbial Biotechnol*, 23:543-552.
- Tohamy EY (2006). **Purification and characterization of exoinulinase enzyme from *Sterptomyces griseus*.** *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9:911-916.
- Tsujimoto Y, Watanabe A, Nakano K, Watanabe K, Matsui H, Tsuji K, Tsukihara T, Suzuki Y (2003). **Gene cloning, expression, and crystallization of a thermostable exo-inulinase from *Geobacillus stearothermophilus* KP1289.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 62:180-185.

- Wanker E, Huber A, Schwab H (1995) **Purification and characterization of *Bacillus subtilis* levanase produced in *Escherichia coli*** *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1953-1958.
- Verhaest M, Ende WV, Roy KL, Ranter CJD, Laere AV, Rabijns A (2005) **X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus***. *The Plant Journal*, 41:400-411.
- Vieille C, Zeikus GJ (2001). **Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. American Society for Microbiology, 1-43.
- Yuan XL, Goosen C, Kools H, Maarel MJEC, Hondel CAMJJ, Dijkhuizen L Ram AFJ. (2006). **Database mining and transcriptional analysis of genes encoding inulin-modifying enzymes of *Aspergillus niger***. *Microbiology*, 152:3061-3073.
- Zittan L, (1981). **Enzymatic hydrolysis of inulin-an alternative way to fructose production**. *Starch*, 33:373-377.