

Analisis *in-Silico* pGEM-GLL Recombinan Glukoamilase *Saccharomycopsis fibuligera* R64

Pasjan Satrimafitrah¹⁾

¹⁾ Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Tadulako Kampus Bumi Tadulako Tondo Palu, Sulawesi Tengah 94117
E.mail: pasjan82@yahoo.com

ABSTRACT

Saccharomycopsis fibuligera is yeast with high amylolytic activity. The local strain, *S. fibuligera* R64 has been reported to produce starch hydrolyzing enzymes, α -amylase dan glucoamilase. Glucoamilase is one of the extracellular enzymes that enable to breakdown starch in starch processing, thus has potential to be developed and applied in starch processing industry, such as glucose syrup production. Wild type microorganism-producing glucoamilase normally express low level of enzyme, while high level production and low cost enzymes are needed in many industries. To obtain strains with superior properties, a recombinant DNA is used and *Pichia pastoris* is a suitable expression host for producing glucoamilase at high level. Gene encoding glucoamilase *S. fibuligera* R64 (*GLL*) has been amplified and cloned into pGEM-T vector. A set of primers (Glu-F and Glu-R) was designed based on the published nucleotide sequence (Acc. No M17355). Restriction analysis of pGEM-*GLL* by using *EcoRI* and *XhoI* showed a ~4.500 kb DNA fragment which confirmed the size of pGEM-T vector containing *GLL*. This research aimed to analyze pGEM-*GLL S. fibuligera* R64 *in silico*. Gene alignment of *GLL S. fibuligera* R64 with *GLU1 S. fibuligera* showed 99 % homology. Based on *in silico* translation analysis, there were several nucleotide difference compared to the published sequence which result in amino acid differences, namely E27D, N46D, dan A376V. Hence it is possible that *S. fibuligera* R64 has different properties from other known *S. fibuligera*.

Key words: *Glucoamilase, S. fibuligera, E. coli TOP10F'*, PCR, *in silico* analysis.

PENDAHULUAN

Pati adalah polimer yang sangat melimpah di alam. Pati terdapat pada daun, batang, biji, akar, dan umbi tanaman tingkat tinggi. Pati berfungsi sebagai cadangan energi pada tanaman. Pati juga digunakan dalam berbagai industri, seperti produksi sirup glukosa, sirup jagung, dan bioetanol.

Indonesia adalah negara yang memiliki sumber pati terbesar di dunia setelah Brazil. Namun, sampai saat ini Indonesia masih mengimpor pati termodifikasi. Selain itu, enzim-enzim pengubah pati juga masih diimpor oleh Indonesia. Hal ini disebabkan oleh belum adanya industri dalam negeri yang memproduksi enzim-enzim tersebut. Padahal Indonesia memiliki biodiversitas mikroba yang tinggi dan potensial untuk menghasilkan enzim pengubah pati, salah

satunya adalah *Saccharomycopsis fibuligera*.

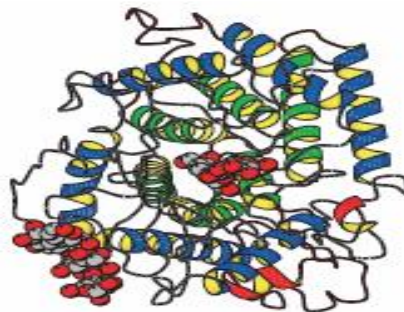
Glukoamilase *S. fibuligera* merupakan salah satu enzim ekstraseluler yang mampu memecah pati dalam pemrosesan pati, dengan demikian memiliki potensi untuk dapat dikembangkan dan diaplikasikan dalam industri pengolahan pati, seperti produksi sirup glukosa.

Glukoamilase adalah enzim *ex-acting* yang menghidrolisis ikatan α -1,4 glikosidik pada ujung non pereduksi dari amilosa, amilopektin dan glikogen yang menghasilkan D-glukosa sebagai produk tunggal. Glukoamilase juga menghidrolisis ikatan α -1,6 dan α ,1-3 pada kecepatan yang lebih lambat (Fogarty, 1983).

Glukoamilase dapat diperoleh dari berbagai organisme. Beberapa organisme yang diketahui menghasilkan enzim glukoamilase adalah *Aspergillus awamori* (Aleshin *et al.*, 1994), ragi *Saccharomycopsis fibuligera* (Sevcik *et al.*, 1998), dan bakteri *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* (Aleshin *et al.*, 2003).

Saccharomycopsis fibuligera mampu memproduksi enzim

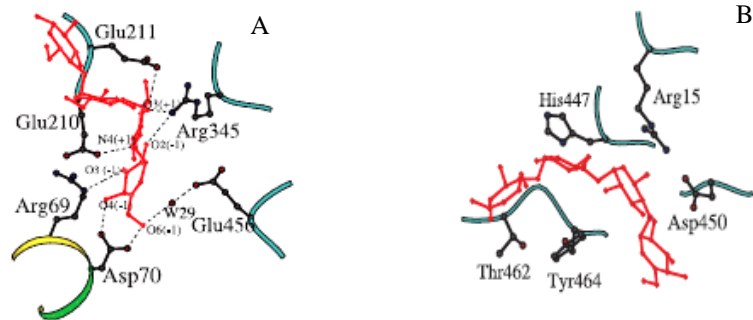
glukoamilase. Dua di antaranya adalah Glu dari *Saccharomycopsis fibuligera* HUT7212 dan Glm dari *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111. Glu HUT7212 mengandung 492 residu asam amino dan Glm IFO 0111 mengandung 489 residu asam amino. Kedua enzim glukoamilase tersebut memiliki karakter biokimia yang berbeda terutama dalam mendegradasi pati mentah. Glu dapat mengikat pati tetapi tidak dapat mendegradasi pati mentah, sedang Glm dapat mengikat pati mentah dengan baik dan juga mendegradasinya. Domain katalitik glukoamilase *Saccharomycopsis fibuligera* membentuk 14 lipatan α heliks di mana 12 diantaranya membentuk konformasi $(\alpha/\alpha)_6$ barrel. Asam amino Glu210 dan Glu456 merupakan residu sisi katalitik glukoamilase *Saccharomycopsis fibuligera* HUT7212, sedang Glu211 dan Glu453 merupakan residu aktif pada glukoamilase *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111. Analisis hasil penentuan kompleks struktur antara glukoamilase *Saccharomycopsis fibuligera* HUT 7212 dengan akarbosa pada resolusi 1.6 $^{\circ}$ A menunjukkan bahwa dua akarbosa terikat pada enzim (Gambar 1). Pengikatan akarbosa pertama terjadi pada sisi aktif, sedang yang kedua terjadi pada daerah sekitar Tyr464 (Sevcik *et al.*, 2006).



Gambar 1. Glukoamilase *Saccharomycopsis fibuligera* HUT 7212 dengan dua molekul akarbosa. Akarbosa pertama (konformasi bola) terikat pada pusat barel, sedang yang kedua terikat jauh dari pusat barel. Sisi pengikatan akarbosa kedua ekuivalen dengan sisi pengikatan pati pada enzim Glu.

Kemiripan urutan Glu *Saccharomycopsis fibuligera* HUT7212 dengan Gln *Saccharomycopsis fibuligera* IFO 0111 menunjukkan bahwa posisi sisi pengikatan pati pada kedua enzim tersebut adalah ekuivalen. Sisi pengikatan pati mentah pada Gln tersusun atas residu Arg15, His444,

Asp447, Thr459, dan Phe461, dan pada enzim Glu, residu asam amino yang ekuivalen untuk sisi pengikatan pati mentah adalah Arg15, His447, Asp450, Thr462, Tyr464. Interaksi kedua akarbosa pada sisi katalitik dan sisi pengikat pati pada enzim Glu *S. fibuligera* HUT7212 dapat dilihat pada Gambar 2 (Sevcik *et al.*, 2006).



Gambar 2. Interaksi akarbosa pada enzim Glu. Akarbosa berikatan hidrogen dengan residu sisi aktif Glu210 dan Glu456 (A), akarbosa terikat disekitar Tyr464 (B) (Sevcik *et al.*, 2006).

Salah satu kendala produksi enzim glukoamilase *wild type* adalah produktivitasnya rendah, sedangkan dalam industri diperlukan mikroba dengan produktivitas yang tinggi dan ekonomis. Untuk menghasilkan galur mikroba dengan sifat-sifat yang unggul ini, dapat dimanfaatkan teknologi DNA rekombinan. Enzim-enzim tersebut dapat dihasilkan dalam sistem ekspresi protein heterolog, seperti *E. coli*, *S. cerevisiae* dan *P. pastoris*. *Pichia pastoris* merupakan sistem ekspresi yang sesuai untuk produksi enzim skala besar. Amplifikasi dan insersi gen pengkode glukoamilase *S. fibuligera* R64 galur lokal pada vektor pGEM-T sebagai langkah awal untuk produksi glukoamilase *S. fibuligera* rekombinan telah dilakukan sebelumnya (Pasjan, 2010). Oleh karena itu perlu dilakukan

penentuan urutan nukleotida pGEM-GLL, dan analisis *in silico* GLL rekombinan.

METODE PENELITIAN

A. Galur

Escherichia coli TOP 10F' dengan fenotip {*proAB*, *Lacl^q*, *lacZΔM15*, *Tn10(Tet^R)*} *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZΔM15*, Δ *lacX74*, *deoRrecA1*, λ -*araD139*, *galU*, *galK*, Δ (*ara-leu*)7697, *rpsL(Str^R)*, *endA1*, *nupG* (Invitrogen).

Saccharomycopsis fibuligera R64 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik Industri, Institut Teknologi Bandung.

B. Plasmid

Plasmid yang digunakan adalah pGEM-T® (Promega) dengan *marker* ampisilin. Plasmid ini digunakan untuk memperbanyak gen *GLL* hasil PCR. Plasmid rekombinan pGEM-GLL yang telah diklon sebelumnya (Pasjan, 2010).

1. Isolasi plasmid pGEM-GLL skala kecil

Isolasi DNA plasmid skala kecil dilakukan dengan menggunakan metode Holmes dan Quigley yang telah dimodifikasi (Sambrook *et al.*, 1989). Koloni tunggal *E. coli* transforman yang mengandung plasmid pGEM-GLL ditumbuhkan pada 5 mL media cair LB yang mengandung ampisilin 100 µg/ml. Inokulum diinkubasi pada suhu 37 °C dengan laju pengocokan 150 rpm (Shaking inkubator Labline) selama 16-18 jam. Sel biakan disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet dire-suspensi dalam 350 µL buffer STET (8 % b/v sukrosa, 5 % b/v triton X-100, 50 mM EDTA, dan 50 mM Tris-Cl pH 8,0). Suspensi sel ditambahkan 25 µL lisozim 10 mg/ml, kemudian diinversi 4-5 kali secara perlahan dan didiamkan pada suhu kamar selama 2 menit. Selanjutnya suspensi sel dimasukkan dalam air mendidih selama 40 detik. Setelah itu, tabung disentrifugasi pada 13.000 rpm (*Biofuge heraus*) selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung mikrosentrifuga baru dan ditambahkan 200 µL isopropanol. Campuran diinversi sebanyak 4 – 5 kali dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya tabung disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm untuk memperoleh pelet DNA dan selanjutnya dikeringkan pada suhu 37 °C selama 30 – 60 menit hingga isopropanol menguap dan habis. Terakhir, pelet DNA yang diperoleh

dilartutkan dalam ddH₂O dan disimpan pada suhu -20 °C.

2. Pemotongan DNA plasmid dengan enzim *EcoRI* dan *XhoI*

DNA plasmid yang mengandung fragmen *GLL* dipotong dengan 10 unit enzim restriksi *EcoRI* (Boehringer Manneheim) dengan menggunakan buffer H (10 mM tris-HCl pH 7,4; 400 mM NaCl; 0,1 M EDTA, 1 mM DTT; 0,15% Triton X-100; 0,5 mg/ml BSA; dan 50 % gliserol) dan 10 unit enzim restriksi *XhoI* dengan buffer H yang sama. Pemotongan tersebut dilakukan pada suhu 37 °C selama semalam.

3. Penentuan urutan nukleotida pGEM-GLL

Sekuensing gen *GLL* dilakukan dengan metode dideoksi Sanger menggunakan alat sekuensing otomatis dari ABI PRISM di Macrogen, Seoul-Korea. Primer yang digunakan untuk sekuensing gen *GLL* ini adalah primer universal T7 promoter dan SP6.

4. Analisis *In silico*

Analisis *in silico* menggunakan program komputer SeqMan dan Clone Manager. Untuk menganalisis urutan asam amino, digunakan program ProtParam Tool pada situs ExPasy (<http://expasy.org>, tanggal akses : 1 April 2010).

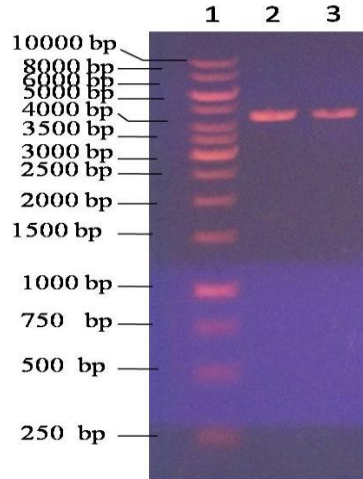
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Isolasi dan karakterisasi plasmid pGEM-GLL

Isolasi plasmid dilakukan untuk menganalisis *E. coli* TOP10F' transforman yang membawa plasmid pGEM-GLL. Isolasi plasmid dilakukan dengan metode *QIAPrep* yang menggunakan prinsip kromatografi afinitas. Plasmid DNA hasil isolasi dielektroforesis pada gel agarosa dan divisualisasi di bawah sinar UV. Hasil

analisis isolasi plasmid pGEM-GLL dikonfirmasi dengan analisis restriksi menggunakan enzim restriksi *EcoRI* dan *XhoI* untuk menentukan adanya sisipan gen *GLL*.

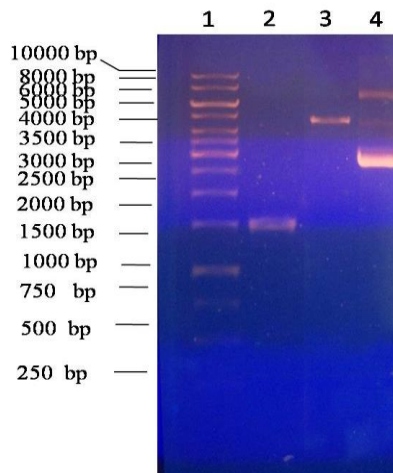
Adanya sisipan gen *GLL* dapat diketahui dengan melihat profil pita DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa seperti yang terlihat pada gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Hasil restriksi pGEM-GLL rekombinan. Lajur 1. DNA ladder; lajur 2. pGEM-GLL (*EcoRI*); lajur 3. pGEM-GLL (*XhoI*).

Inseri *GLL* (± 1.500 pb) ke pGEM-T (± 3.000 pb) menghasilkan plasmid rekombinan yang masing-masing berukuran ± 4.500 pb (lajur 1

dan 2 pada gambar 1 dan lajur 3 pada gambar 2). Kedua plasmid rekombinan tersebut masing-masing dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *XhoI*.



Gambar 4. Hasil isolasi dan karakterisasi pGEM-GLL rekombinan. Lajur 1. DNA ladder; lajur 2. *GLL* (1500 bp); lajur 3. pGEM/*GLL* cut (4500 bp); lajur 4. pGEM-GLL uncut.

Pada gambar 4 terlihat perbedaan profil pita DNA antara gen *GLL* hasil amplifikasi, pGEM-*GLL* linear hasil pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRI*, dan pGEM-*GLL* sirkuler.

B. Analisis in silico *GLL S. fibuligera* R64

Untuk mengkonfirmasi lebih lanjut bahwa DNA sisipan yang masuk ke dalam vektor pGEM-T memang benar gen *GLL*,

maka dilakukan sekuensing urutan nukleotida gen tersebut.

Penentuan urutan nukleotida dari pGEM-*GLL* dengan metode Sanger (*Macrogen Inc.*, Korea) menggunakan primer universal pGEM-T, yaitu primer *forward* T7 (5'-AATACGATCACTATAG-3') dan primer *reverse* SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'). Hasil penentuan urutan nukleotida dengan primer universal T7 dan SP6 dapat dilihat pada gambar 5 dan gambar 6.

```

1  nnnnnnannc  acgcggtggg  agctctccca  tatggtcgac  actgcaggcg  gccgcactag
61  tgattgagga  actcgagcca  aagccttgac  cttatttcta  agtctaatag  cttcaagaag
121 agcaccactg  ctccatgtca  aagagtaggc  accggtggaa  taaccggtat  atctgttaag
181 ttgttcattc  aaggagccat  catcattaat  atgatccaaa  atgacttgca  aaaaggaatc
241 accgaatgtg  accaaattat  cagcaaccgt  gttaaattca  tcagagccac  ttttaatggt
301 gacactatca  gaagactygt  aagcagaatt  gatggtagat  aatcaacaa  tatacttggt
361 aaaaaaatcg  tagttaatct  tgtaaatggt  aatgtcattt  gaggcagact  ttgcatcata
421 aacaagtttg  tatggaactt  gggcagcata  ggcagtagct  aagaaccatg  gattgccttc
481 agatgaacca  tcaccattgt  aaacatcttc  tgggtatctg  ccaatagctg  caccagcaga
541 ataagcactg  ttaacagagt  atctgtcttt  attatcctcc  aataacaagt  aatgatgattg
601 caaacatac  tcattgtcaa  catcaaatgg  agtagagctg  ctttcaccaa  tatcatgagt
661 caaaagtggg  ccaatataag  tggctgaatc  taggccttgt  ctagagtttt  gttggagcaa
721 atctgggttt  tcaacaatgt  ggtaacatc  agtattaaca  aatccacat  cactgccact
781 caaataactt  tcgagggtag  aagcagtcga  agaaagtgtg  tttgcaaagt  cgccatcgtc
841 aaaacttttg  gcatatccac  agcataagca  aggtctttct  gttgaacaag  ctttgtacaa
901 aagctgtctg  ccattggttt  tcccccaaa  gatcacactc  agtagatcc
    
```

Gambar 5. Hasil penentuan urutan nukleotida gen *GLL* pada DNA rekombinan pGEM-*GLL* dengan primer universal SP6 promoter. Nukleotida yang digaris bawah merupakan urutan nukleotida primer Glu-R yang digunakan pada tahap PCR.

```

1  nnnannnnnn  nccatgctcc  ngccgccatg  gccgcgggat  tgaggaagaa  ttcgcctatc
61  cttcttttga  agcttattca  aactataaag  ttgacagaac  tgacttggaa  accttcttgg
121 acaaacaaaa  agatgtatct  ttatactatc  ttttacaaaa  cattgcttat  cctgaaggcc
181 aatttaatag  tgggtttcct  ggtactgtta  ttgcttctcc  atcaacctct  aatccggact
241 actattacca  atggaccaga  gattccgcaa  ttacattttt  gacagtctct  tctgaactag
301 aagataataa  cttcaatacc  actttggcta  aggcagttga  gtactacatt  aataccagtt
361 acaaccttca  aagaaccagt  aacccaagtg  gcagctttga  tgatgaaaat  cataaaggct
421 tgggagaacc  aaaaattaac  acagatggtt  ctgcatacac  tggagcttgg  gggagaccgc
481 aaaatgatgg  tcctgctttg  agagcttatg  ctatcagtag  atatttgaat  gatgtcaatt
541 ctttaaatga  aggtaaatta  gtattgactg  attcaggtga  tatcaacttt  tcttcaactg
601 aagatattta  caaaaatata  atcaaaccag  acttgggaata  tgttataggg  tactgggatt
661 ctactgggtt  tgatctttgg  gaggaaaacc  aaggcagaca  cttttttaca  agcttggttc
721 acacacagcc  cttgcttatg  ctgtggattt  tgctctaagt  tctgaccatg  gttacttcgc
    
```

Gambar 6. Hasil penentuan urutan nukleotida gen *GLL* pada DNA rekombinan pGEM-*GLL* dengan primer universal T7 promoter. Nukleotida yang digaris bawah merupakan urutan nukleotida primer Glu-F yang digunakan pada tahap PCR.

Dari hasil penentuan urutan nukleotida gen *GLL*, dapat dilihat adanya primer Glu-F dan Glu-R pada gen *GLL S. fibuligera* R64 tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa proses kloning *GLL* ke pGEM-T berhasil dilakukan.

Elektroforegram urutan nukleotida gen *GLL* dengan menggunakan primer T7 dan SP6. Terbentuknya struktur sekunder pada urutan nukleotida gen *GLL* ini menyebabkan proses pengurutan nukleotida tidak berjalan sempurna sehingga terdapat urutan

nukleotida dengan puncak elektroforegram yang sangat rendah.

Urutan nukleotida *GLL S. fibuligera* R64 hasil sekuensing kemudian disejajarkan dengan urutan nukleotida *GLU1 S. fibuligera* yang telah dipublikasi.

Hasil analisis *in silico* menggunakan program komputer SeqMan dan Clone Manager menunjukkan bahwa urutan nukleotida tersebut merupakan urutan nukleotida bagi gen *GLL Saccharomycopsis fibuligera* R64 tanpa *signal sequence*.

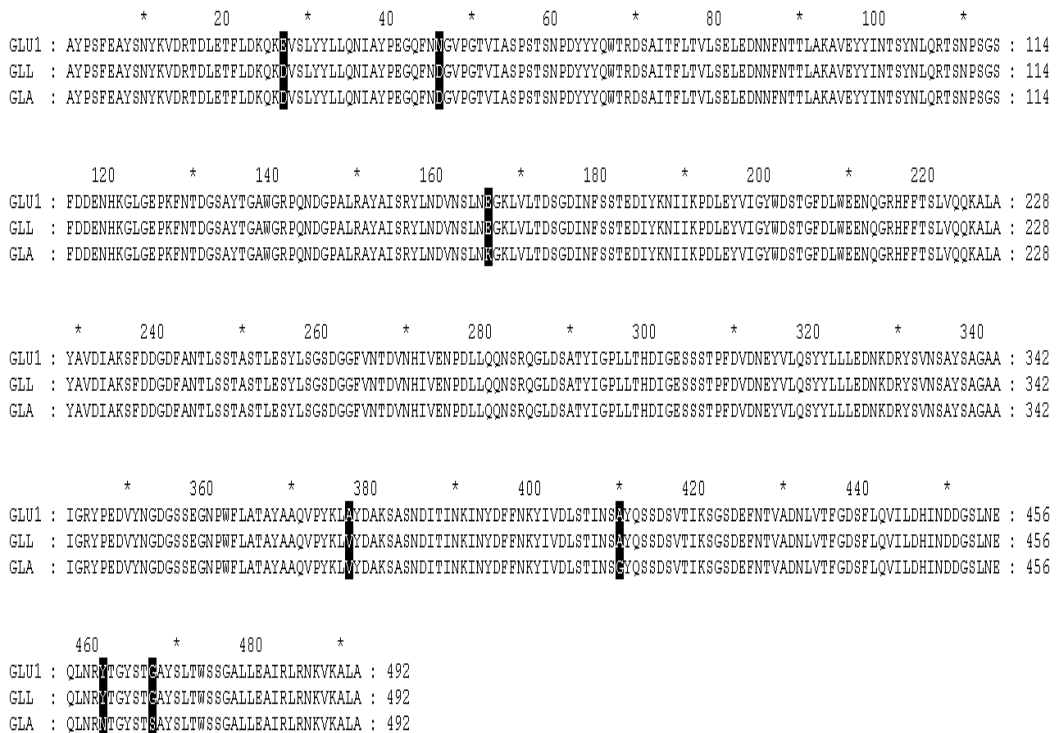
GLL	1	GCCTATCCTCTTTTGAAGCTTATCAAACTATAAAAGTTGACAGAACTGACTTGGAAACCTCTTTGGACAAAACAAAAGATGTATCTTTATACTATCTTTTACAAAACATGCTTATCTGAAAGCCAAATTAATCATGG
GLU1	1	GCCTATCCTCTTTTGAAGCTTATCAAACTATAAAAGTTGACAGAACTGACTTGGAAACCTCTTTGGACAAAACAAAAGATGTATCTTTATACTATCTTTTACAAAACATGCTTATCTGAAAGCCAAATTAATCATGG
GLL	141	TGTTCTCGGTACTGTATTGCTTCTCCATCAACCTCTAATCCGGACTACTATTACCAATGGACAGAGATCCGCAATTACATTTTGACAGTCTTTCTGCACTAGAAGATAAATCACTCAATACCACTTTGGCTAAGG
GLU1	141	TGTTCTCGGTACTGTATTGCTTCTCCATCAACCTCTAATCCGGACTACTATTACCAATGGACAGAGATCCGCAATTACATTTTGACAGTCTTTCTGCACTAGAAGATAAATCACTCAATACCACTTTGGCTAAGG
GLL	281	CAGTGTAGTACTACATTAACTACCACTTCAAAAGAACAGTAAACCCAACTGGCAGCTTTGATGATGAAAATCATAAAGGCTTGGGAGAACAAAATTTAACACAGATGGTTCTGCATACATGGAGCTTGGGGG
GLU1	281	CAGTGTAGTACTACATTAACTACCACTTCAAAAGAACAGTAAACCCAACTGGCAGCTTTGATGATGAAAATCATAAAGGCTTGGGAGAACAAAATTTAACACAGATGGTTCTGCATACATGGAGCTTGGGGG
GLL	421	AGACCGCAAAATGATGGTCTGCTTGGAGCTTATGCTATCAGTAGATATTGAAATGATGCAATTCTTTAAATGAAGTAAATAGTATTGACTGATTCAGTGTATCAACTTTTCTCAACTGAAGATATTACAA
GLU1	421	AGACCGCAAAATGATGGTCTGCTTGGAGCTTATGCTATCAGTAGATATTGAAATGATGCAATTCTTTAAATGAAGTAAATAGTATTGACTGATTCAGTGTATCAACTTTTCTCAACTGAAGATATTACAA
GLL	561	AAATATCATCAAAACAGACTTGGAAATATGTTATAGGCTACTGGGATCTACTGGTGTGATCTTTGGAGGAAAACCAAGGCAGACACTTTTTTACAAGCTTGGTTCAACAGAAAGCCCTTCTTATGCTGCGATATG
GLU1	561	AAATATCATCAAAACAGACTTGGAAATATGTTATAGGCTACTGGGATCTACTGGTGTGATCTTTGGAGGAAAACCAAGGCAGACACTTTTTTACAAGCTTGGTTCAACAGAAAGCCCTTCTTATGCTGCGATATG
GLL	701	CAAAAAGTTTTGACGACGGGCACTTTGCGAACACACTTTCTTCGACTGCTTCTACCCCTCGAAAGTAAATTTGAGTGGCAGTGTGGAAATTTGTAATACTGATGTTAACCCACTTGTGAAAACCCAGATTTGCTTCAA
GLU1	701	CAAAAAGTTTTGACGACGGGCACTTTGCGAACACACTTTCTTCGACTGCTTCTACCCCTCGAAAGTAAATTTGAGTGGCAGTGTGGAAATTTGTAATACTGATGTTAACCCACTTGTGAAAACCCAGATTTGCTTCAA
GLL	841	CAAAACTCTAGACAAGGTCTAGATTACGACCACATATATTGGCCCACTTTTGACTCATGATATTGGTGAAGCAGCTTACTCCATTGATGTTGACAAATGATGTTGTAATACTGATGTTTGGCAATATACTTGTATTGGAGGATAA
GLU1	841	CAAAACTCTAGACAAGGTCTAGATTACGACCACATATATTGGCCCACTTTTGACTCATGATATTGGTGAAGCAGCTTACTCCATTGATGTTGACAAATGATGTTGTAATACTGATGTTTGGCAATATACTTGTATTGGAGGATAA
GLL	981	TAAAGACAGATACCTCTGTTAAACAGTCTTATTCTGCTGGTGCAGCTATTGGCAGATACCCGAAGATGTTTACAATGGTATGCTTCACTGAAAGCCAAATCCATGGTCTTAGCTACTGCTATGCTGCCAAGTTCACAT
GLU1	981	TAAAGACAGATACCTCTGTTAAACAGTCTTATTCTGCTGGTGCAGCTATTGGCAGATACCCGAAGATGTTTACAATGGTATGCTTCACTGAAAGCCAAATCCATGGTCTTAGCTACTGCTATGCTGCCAAGTTCACAT
GLL	1121	ACAAAAGTTTTATGATGCAAAAGCTTGGCTCAAAATGACATTAACCAATTAACAGAAATTAACACTGATTTTTTTTAAACAAGTATATTGTTGATTTATCTACCAATCTGCTTACCAGTCTTCTGATAGTGTCCACCATTTAAA
GLU1	1121	ACAAAAGTTTTATGATGCAAAAGCTTGGCTCAAAATGACATTAACCAATTAACAGAAATTAACACTGATTTTTTTTAAACAAGTATATTGTTGATTTATCTACCAATCTGCTTACCAGTCTTCTGATAGTGTCCACCATTTAAA
GLL	1261	AGTGGCTCTGATGAATTTAACACGGTGTGCTGATAAATTTGGTCACATTTGGTGATTTCTTTTTCGAAGTCAATTTGGATCATATTAATGATGATGGCTCTTGAATGAACCACTTAACAGATATACCGGTTATTCACCGG
GLU1	1261	AGTGGCTCTGATGAATTTAACACGGTGTGCTGATAAATTTGGTCACATTTGGTGATTTCTTTTTCGAAGTCAATTTGGATCATATTAATGATGATGGCTCTTGAATGAACCACTTAACAGATATACCGGTTATTCACCGG
GLL	1401	TGCCTACTCTTTGACATGGAGCAGTGGTCTCTCTTGAAGCTATTAGACTTAGAAAATAAGGTCAAGGCTTTGGCT
GLU1	1401	TGCCTACTCTTTGACATGGAGCAGTGGTCTCTCTTGAAGCTATTAGACTTAGAAAATAAGGTCAAGGCTTTGGCT

Gambar 7. Penjajaran urutan nukleotida gen *GLL S. fibuligera* R64 dengan gen *GLU1 S. fibuligera* yang telah dipublikasi (Acc. No. M17355).

Dari hasil penjaran antara gen *GLL S. fibuligera* R64 dengan gen *GLU1 S. fibuligera* yang telah dipublikasi (Acc. No. M17355) menunjukkan homologi sebesar 99%. Terdapat beberapa perubahan urutan nukleotida pada *GLL* hasil sekuensing terhadap *GLU1 S. fibuligera*. Perubahan urutan nukleotida ini hanya mengubah

beberapa asam amino tapi tidak kestabilan protein maupun mengubah sisi katalitiknya.

Urutan nukleotida gen *GLL S. fibuligera* R64 dideduksi secara *in silico*. Urutan asam amino hasil deduksi gen *GLL* tersebut kemudian disejajarkan dengan gen *GLU1 S. fibuligera* (Acc No. M17355) dan *GLA1 S. fibuligera* KZ.



Gambar 8. Penjaran urutan asam amino *GLL S. fibuligera* R64 dengan gen *GLU1 S. fibuligera* yang telah dipublikasi (Acc. No. M17355) dan *GLA1 S. fibuligera* KZ. (asam amino yang disorot warna hitam adalah asam amino yang berbeda).

Dengan menggunakan program pada situs Sanger Institute (<http://pfam.sanger.ac.uk>, tanggal akses: 1 Januari 2010) diperoleh

informasi sisi katalitik dari *GLL S. fibuligera* R64, *S. fibuligera* yang telah dipublikasi, dan Glukoamilase *GLA1 S. fibuligera* KZ yaitu residu E 210 dan E456. Adapun

perubahan-perubahan residu asam amino terjadi pada posisi E27D, N46D, dan A376V untuk *GLU1* terhadap *GLL* dan posisi K66E, G410A, N461Y, dan S467G untuk *GLA1* terhadap *GLL*. Berdasarkan analisis translasi *in silico*, terdapat beberapa perubahan urutan nukleotida pada *GLL* hasil sekuensing terhadap *GLU1 S. fibuligera* dan *GLA1 S. fibuligera* KZ yang menyebabkan perubahan urutan asam amino sehingga ada kemungkinan perbedaan sifat dengan glukamilase *S. fibuligera* lainnya. Dengan menggunakan aplikasi ProtParam Tool pada situs ExPasy (<http://expasy.org>, tanggal akses: 1 Januari 2010), diperoleh informasi bahwa perubahan-perubahan residu asam-amino tersebut tidak mengganggu stabilitas proteinnya.

Residu pengikat pati antara *GLL S.fibuligera* R64 hasil sekuensing, *GLU1 S. fibuligera* yang telah dipublikasi, dan *GLA1 S. fibuligera* KZ adalah ekuivalen, yaitu Arg15, His447, Asp450, Thr462, dan Tyr464.

GLL S. fibuligera R64 dan *GLU1 S. fibuligera* (Acc. No. M17355) yang tersusun dari sebanyak 492 asam amino memiliki homologi 99% dengan Glukoamilase *S. fibuligera* HUT7212 yang juga tersusun atas 492 asam amino.

Perbedaan residu pengikat pati antara *GLL S.fibuligera* R64 hasil sekuensing, *GLU1 S. fibuligera* yang telah dipublikasi, *GLA1 S. fibuligera* KZ dan Glm *S. fibuligera* IFO 0111 terletak pada satu residu asam amino Tyr464. Pada Glm, Tyr464 digantikan oleh Phe461.

Sevchik (1998) melaporkan bahwa Glu *S. fibuligera* HUT7212 dan Glm *S. fibuligera* IFO 0111 memiliki homologi 77 %. Kedua enzim tersebut memiliki perbedaan sifat biokimia, khususnya dalam mendegradasi pati mentah. Glu HUT72112 mampu

mengikat pati, akan tetapi tidak mampu mendegradasi pati mentah, sedangkan IFO 0111 mampu mengikat dan mendegradasi pati mentah. Oleh karena itu, *GLL S. fibuligera* R64 dan *GLU1 S. fibuligera* (Acc. No. M17355) dapat diduga mampu mengikat pati, akan tetapi tidak mampu mendegradasi pati mentah, sedangkan Glm IFO 0111 mampu mengikat dan mendegradasi pati mentah.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut:

1. Kloning gen *GLL* (\pm 1.476 pb) pada vektor pGEM-T (\pm 3.000 pb) telah menghasilkan plasmid rekombinan pGEM-*GLL* berukuran \pm 4.476 pb.
2. Hasil analisis *in silico* menunjukkan bahwa urutan nukleotida tersebut merupakan urutan nukleotida bagi gen *GLL Saccharomycopsis fibuligera* R64 tanpa *signal sequence*.
3. Hasil penjajaran urutan asam amino *GLL S. fibuligera* R64 dengan gen *GLU1 S. fibuligera* yang telah dipublikasi, dan *GLA1 S. fibuligera* KZ menunjukkan perubahan-perubahan residu asam amino terjadi pada posisi E27D, N46D, dan A376V untuk *GLU1* terhadap *GLL* dan posisi K66E, G410A, N461Y, dan S467G untuk *GLA1* terhadap *GLL*.

Saran:

Dilakukan penelitian lebih lanjut dengan mengekspresikan gen *GLL* ke vektor ekspresi pPICZ α -A dan diekspresikan pada *Pichia pastoris*.

DAFTAR PUSTAKA

Arbige, M. V. dan Pitcher, W. H., (1989) : Industrial enzymology: a look

- towards the future, *Trends in Biotechnology*, 7, 330-335.
- Aleshin, A. E., Feng, P. H., Honzatko, R. B., dan Reilly, P. J. (2003) : Crystal structure and evolution of prokaryotic glucoamylase. *Journal of Molecular Biology*, 327, 61-73
- Aleshin, A.E. Firsov, L.M. Honzatko, R.B.(1994) : Refined structure for the complex of acarbose with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.4-Å resolution, *Journal of Biological Chemistry*, 269, 15631-15639
- Bentley, I. S., dan Williams (1996) : Starch conversion. In T. Godfrey and S. West (ed.), *Industrial enzymology*, 2nd ed., The Macmillan Press Ltd., London, United Kingdom , p. 341–357.
- Bertoldo, C. dan Antranikian, G. (2002) : Starch hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria, *Current Opinion Chemistry*, 6, 151-160.
- Cha, H. J., Kim, K. R., dan Hwang, B., (2007) : Enhancement of secreted production of glucoamylase through fed-batch bioreactor culture of recombinant yeast harboring glucose-controllable SUC2 promoter, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 24(5), 812-815
- Cregg, J.M. (1999) : Expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression, San Diego Academic Press,157-191.
- De Mot, R., Andries , K. dan Verachtert, H. (1984) : System Application of Microbiology, *American Society of Microbiology News*, 5, 106-118.
- Fogarty, W. M., (1983) : Microbial amylases. In *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science Publishers, London,1–29.
- Hamilton, S., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R.C., Li, H., Mitchell, T., Nett, J.H., Rausch, S., Stadheim, T.A., Wischnewski, H., Wildt, S., dan Gerngross, T.U.(2003) : Production of complex human glycoproteins in yeast, *Science* 301, 1244–1246.
- Harris,E.M., Aleshin, Firsov, L.M., dan Honzatko, R.B., (1993) : Refined structure for the complex of 1-deoxynojirimycin with glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. X100 to 2.4-Å resolution, *Biochemistry*, 32.1618-1626.
- Horváthová, V., Janeček, S. dan Sturdík, E.(2001) : Amylolytic enzymes: Molecular aspects of their properties. *General Physiology and Biophysics*, 20, 7-32.
- Hostinova, E. (1993) : Glucoamylases encoded by variant *Saccharomycopsis fibuligera* genes: Structure and properties, *Current microbiology*, 27, 11-14
- Itoh, T., Ohtsuki, I., Yamashita, I., dan Fukui, S., (1987) : Nucleotide Sequence of the Glucoamylase Gene GLUI in the Yeast *Saccharomycopsis fibuligera*, *Journal Bacteriology*, 169(9), 4171 – 4176.
- James, J. A. dan Lee, B. H., (1997) : Glucoamylase: Microbial sources, industrial application and molecular biology—A review. *Journal of Food Biochemistry*, 21, 1–52.
- Juge Natalie, Caroline S. M. Furniss, A. Patrick Gunning, Vic J. Morris, Gary Williamson dan Birte Svensson.(2002) : The starch binding domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*: overview of its

- structure,function, and role in raw-starch hydrolysis, *Biologia, Bratislava, 57/Supplement, 11: 239*
- Karakas, B. Inan, M. dan Certel, M. (2009) : Expression and characterization of *Bacillus subtilis* PY22 α -amylase in *Pichia pastoris*, *Journal of Molecular Catalysis, B, 1-6*
- Kirk, O. B. (2002) : Industrial Enzyme Application. *Current Opinion in Biochemistry, 345-351.*
- Manjunath, P., Shenoy, dan Rao, C. (1983) : Fungal glucoamylase. *Journal of Applied Biochemistry, 5, 235–260*
- Mc Cann, A. K. dan Barnett. J. A. (1986) : The utilization of starch by yeasts. *Yeast, 2, 109-115.*
- Meagher, M. M. dan Reilly, P. J. (1989) : Kinetics of the hydrolysis of di- and trisaccharides by *Aspergillus niger* glucoamylases I and II. *Biotechnology and Bioengineering, 34, 689–693.*
- Nelson,D.L., dan Cox, M. (2006) : Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition, University of Wisconsin, Madison, U.S.A.
- Pandey, A., Nigam, P., dan Mohan R (2000) : Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry, 31, 135-152.*
- Panke, S. M. (2002) : Enzyme Technology and Bioprocess Engineering, *Current Opinion in Biochemistry, 13, 111-116.*
- Reilly, P. J. (1999) : Protein engineering of glucoamylase to improve industrial performance-a review, *Starch, 51, 269–274.*
- Saha, B. C. dan Ueda, S. (1983) : Alcoholic fermentation of raw sweet potato by a nonconventional method using *Endomycopsis fibuligera* glucoamylase preparation, *Biotechnology and Bioengineering, 25, 1181-1186.*
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., dan Maniatis, T. (1989) : Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press
- Sauer, J., Sigurskjold, B. W., Christensen, U., Frandsen, T. P., Mirgorodskaya, E. dan Harrison, M.(2000) : Glucoamylase: structure/function relationships,and protein engineering, *Biochimica and Biophysica Acta, 1543, 275–293.*
- Sevcik, A. Solovicova, E. Hostinova, J. Gasperik, K.S. Wilson, Z. Dauter, (1998) : Structure of glucoamylase from *Saccharomycopsis fibuligera* at 1.7Å^o resolution, *Acta Crystallography, 54, 854-866.*
- Sevcik, A. Solovicova, E. Hostinova, J. Gasperik, K.S. Wilson, Z. dan Dauter (2006) : Structure of the complex of a yeast glucoamylase with acarbose reveals the presence of a raw starch binding site on the catalytic domain, *Federation of European Biochemical Societies Journal, 273, 2161–2171*
- Sierks, M.R. Ford,C. Reilly, P.J., dan Svensson, B. (1990) : Catalytic mechanism of fungal glucoamylase as defined by mutagenesis of Asp176, Glu179 and Glu180 in the enzyme from *Aspergillus awamori*, *Protein Engineering, 3, 193-198.*
- Swift, J., Karandikar, A., dan Alison M. (2000) : The Effect of Organic Nitrogen Sources on Recombinant Glucoamylase Production by

- Aspergillus niger* in Chemostat Culture, *Fungal Genetics and Biology*, 31, 125–133.
- Synowiecki, J. (2007) : The use of starch processing enzymes in the food industry in MacCabe, *Industrial enzymes*, Springer, 19-34.
- Tanaka, Y., Ashikari, Y., Nakamura, N. (1986) : Glucoamylase Produced by *Rhizopus* and by a Recombinant, *Agricultural and Biological Chemistry*, 50, 1737-1742.
- Tester, R. F., Karkalas, J., Qi, X. (2004) : Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship, *World's Poultry Science Journal*, 60, 186-195.
- van Beilen, J. B. (2002) : Enzyme Technology : an overview, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 338-344
- van der Maarel, M. J., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H., dan Dijkhuizen, L. (2002) : Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *Journal of Biotechnology*, 94, 137-155.
- Veenhuis, M., van Dijken, J.P. dan Harder, W. (1983) : The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast, *Advance in Microbial Physiology*, 24, 1-82
- Verdoes, C., Punt, J., dan Hondel, V. (1993) : Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*: molecular genetic analysis of strains containing multiple copies of the *glaA* gene, *Transgenic Research* 2, 84-92.
- White, J. S. (1992) : Fructose syrup: production, properties and applications. In *Starch Hydrolysis Products: Worldwide Technology, Production, and Applications*, eds F. W. Schenck dan R. E. Hebeda. VCH, New York, 177-99.