

Ekspresi dan Karakterisasi β -1,3-Glukanase Rekombinan dari *Burkholderia cepacia* (BiogenCC E76) yang Diekspresikan dalam Sistem Ekspresi *Escherichia coli* (*Expression and Characterization of Recombinant β -1,3-Glukanase of *Burkholderia cepacia* [BiogenCC E76] Expressed in *Escherichia coli* Expression Systems*)

Tri Puji Priyatno^{1*}, Fitriani Winangsih², Ifa Manzila¹, dan Maria Bintang²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: isdihar@yahoo.co.uk

²Departemen Biokimia, Fakultas MIPA, Institut Pertanian Bogor, Jalan Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680 Indonesia

Diajukan: 26 Februari 2019; Direvisi: 7 Juni 2019; Diterima: 18 Juni 2019

ABSTRACT

Burkholderia cepacia (Bcc) BiogenCC E76 isolate is an endophytic bacterium producing cell wall degrading enzyme, glucanase, and antagonistic to fungal pathogens, such as *Magnaporthe grisea* and *Colletotrichum gloeosporioides*. The glucanase is able to lyse fungal cell walls composed of glucan causing disintegrity of mycelia and fungi fail to infect plants. The purpose of this study was to clone, express, and characterize 48 kDa subunit of β -1,3-glucanase from Bcc isolate BiogenCC E76 using the *Escherichia coli* expression system. The ~1,300 bp of the β -1,3-glucanase gene was constructed using the pET-32b vector in *Bam*HI-*Hind*III restriction sites to generate the pET-Glu plasmid. The gene was fused with nucleotides sequence encoding Trx-tag, His-tag, and S-tag producing ~65 kDa of recombinant β -1,3-glucanase. Gene expression in the construct was controlled by the T7 promoter and Trx-tag start codon through IPTG induction. The recombinant β -1,3-glucanase was then purified and its activities were tested at different pH and temperature conditions. Results showed that *E. coli* carrying pET-Glu overexpressed a 65 kDa protein in induced culture as a soluble protein that was expressed in periplasm. Purification result of the crude extract of the recombinant protein obtained 27% pure enzymes with a specific activity of 1,207.976 U/mg and purity level of 3.9 fold. This recombinant glucanase demonstrated optimal activity at 40°C and pH 5–7. A deeper study is needed to understand the role of 48 kDa subunit of β -1,3-glucanase has in antagonistic mechanism of Bcc against pathogenic fungi.

Keywords: *Burkholderia cepacia*, recombinant β -1,3-glucanase, gene expression, glucan.

ABSTRAK

Bakteri endofitik *Burkholderia cepacia* (Bcc) isolat BiogenCC E76 diketahui memiliki aktivitas glukonase dan bersifat antagonis terhadap jamur patogen, seperti *Magnaporthe grisea* dan *Colletotrichum gloeosporioides*. Aktivitas enzim diduga dapat melisis dinding sel jamur yang tersusun atas senyawa glukon dan menimbulkan disintegritas miselia yang mengakibatkan jamur gagal menginfeksi tanaman. Penelitian ini bertujuan mengarakterisasi, mengkloning, dan mengekspresikan gen penyandi enzim glukonase subunit 48 kDa dari bakteri Bcc isolat BiogenCC E76 menggunakan sistem pengekspresian *Escherichia coli*. Gen β -1,3-glukanase (β -1,3-glukanase) yang berukuran ~1.300 bp dikonstruksi ke dalam pET-32b pada situs pemotongan *Bam*HI-*Hind*III untuk menghasilkan plasmid ekspresi pET-Glu. Gen tersebut difusikan dengan urutan basa nukleotida penyandi Trx-tag, His-tag, dan S-tag yang menghasilkan β -1,3-glukanase rekombinan berukuran ~65 kDa. Ekspresi konstruk gen tersebut dikendalikan oleh promotor T7 dengan menggunakan kodon awal/inisiasi (*start codon*) dari Trx-tag melalui induksi dengan IPTG. β -1,3-glukanase rekombinan yang dihasilkan kemudian dipelajari aktivitas enzimnya pada kondisi pH dan suhu tertentu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa strain bakteri *E. coli* pembawa plasmid pET-Glu terdeteksi memiliki protein over-ekspresi berukuran 65 kDa sesuai dengan target. Protein tersebut terekspresi dalam periplasma bakteri sebagai protein yang bersifat terlarut dalam bufer ekstraksi sehingga mudah dimurnikan. Dari hasil purifikasi terhadap ekstrak kasar enzim rekombinan diperoleh 27% protein murni dengan aktivitas spesifik 1.207,976 U/mg dan tingkat kemurnian 3,9 kali. Glukanase rekombinan memiliki aktivitas enzim optimal pada suhu 40°C dan pH 5–7. Hasil penelitian ini sangat penting untuk mempelajari lebih mendalam peran β -1,3-glukanase subunit 48 kDa dalam mekanisme antagonis Bcc terhadap jamur patogen.

Kata kunci: *Burkholderia cepacia*, β -1,3-glukanase rekombinan, ekspresi gen, glukon.

PENDAHULUAN

Burkholderia cepacia (*Bcc*) merupakan salah satu agensia biokontrol patogen tanaman yang telah dikembangkan menjadi biopestisida sejak tahun 1980-an. Namun, karena bakteri ini juga dapat bersifat *opportunistic human pathogen*, pihak Environmental Protection Agency (EPA) Amerika Serikat melakukan moratorium pendaftaran biopestisida berbahan aktif *Bcc* (Parke dan Gurian-Sherman 2002). Meskipun moratorium tersebut belum dicabut hingga saat ini, beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa *Bcc* merupakan agensia biokontrol yang sangat kuat. Hal ini disebabkan oleh kemampuan *Bcc* dalam menghasilkan senyawa antijamur berskala luas, seperti metabolit sekunder pirolnitrin, fenazin, kepabaktin, dan siderofor, serta enzim pendegradasi dinding sel (Li et al. 2002; Kadir et al. 2008; de los Santos-Villalobos et al. 2012). Oleh karena itu, berbagai aplikasi *Bcc* menunjukkan efektivitas tinggi dalam mengendalikan beberapa jamur patogen tanaman, seperti *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, dan *Fusarium oxysporum* (Li et al. 2002), *Erysiphe graminis* dan *Puccinia recondite* (Lee et al. 2006) serta *Colletotrichum gloeosporioides* (Kadir et al. 2008).

Salah satu enzim pendegradasi dinding sel jamur yang dihasilkan *Bcc* ialah β -1,3-glukanase (β -1,3-glukanase, EC 3.2.1.6) (Boaisha 2012) yang bersinonim dengan endo-1,3(4)-beta-glukanase, endo-1,3-beta-D-glukanase, dan beta-1,4-glukanase (KEEG 2019). β -1,3-glukanase merupakan enzim golongan hidrolitik yang mampu mendegradasi senyawa glukana yang menjadi salah satu komponen utama penyusun dinding sel jamur (Pitson et al. 1993). Hampir semua dinding sel jamur memiliki glukana kecuali Oomycetes yang tersusun atas selulosa (Larroque et al. 2012). Hidrolisis β -glukan pada dinding sel jamur dapat menurunkan integritas dinding sel sehingga jamur tidak mampu menginfeksi tanaman (Shetty et al. 2009). Selain *Bcc*, beberapa bakteri endofitik dan rizosfer yang bersifat antijamur dan memiliki aktivitas β -glukanase ialah *Bacillus subtilis* (Leelasuphakul et al. 2006; Narasimhan et al. 2013), *B. halodurans* (Akita et al. 2005), *B. licheniformis* (Chaari et al. 2012), dan *Pseudomonas aeruginosa* (Dikin et al. 2007).

Aktivitas β -1,3-glukanase selain melemahkan integritas dinding sel miselia jamur patogen, juga menghasilkan β -1,3-glukan yang berfungsi sebagai elisitor pemicu respon imun bawaan pada tanaman (Robinson dan Bostock 2015). Elisitor β -1,3-glukan

dapat dihasilkan oleh aktivitas β -1,3-glukanase, baik yang berasal dari tanaman (Mishra et al. 2012) maupun mikroba endofitik (Shoresh et al. 2010; Chen et al. 2016). Induksi elisitor β -1,3-glukan terbukti meningkatkan ketahanan tanaman terhadap virus, bakteri, dan jamur patogen, seperti pada tanaman *Arabidopsis* (Ménard et al. 2004), padi (Inui et al. 1997), alfalfa (Kobayashi et al. 2016), anggur (Aziz et al. 2003), dan kedelai (Fliegmann et al. 2004). Tanaman kedelai yang diinduksi dengan elisitor β -1,3-glukan dari *P. sojae* f.sp. *glycinea* (Fliegmann et al. 2004) dan *P. colocasai* (Sriram et al. 2009) menunjukkan reaksi tahan terhadap penyakit hawar daun. Imun bawaan tanaman yang diinduksi oleh elisitor β -1,3-glukan, yaitu *phenylalanine ammonia-lyase* (PAL), fitoaleksin, isoflavonoid, hidrogen peroksida, dan konsentrasi kalsium-kalmodulin, serta aktivitas kitinase (Mishra et al. 2012).

Pada penelitian sebelumnya dilaporkan bahwa bakteri endofitik *Bcc* (isolat Biogen CC E76) yang diisolasi dari tanaman padi dan antagonistik terhadap *C. gloeosporioides* memiliki aktivitas glukanaase (Manzila et al. 2015). Terdapat tiga subunit glukanaase yang dihasilkan oleh *Bcc* berdasarkan analisis zimogram, yaitu subunit 15 kDa, 48 kDa, dan 55 kDa, tetapi yang memiliki aktivitas enzimatis tinggi hanya subunit 48 kDa. Winangsih et al. (2014) kemudian berhasil mengklon gen penyandi glukanaase subunit 48 kDa berukuran 1.314 bp yang diidentifikasi memiliki kesamaan 99% dengan endo-1,4-D-glukanase (EC 3.2.1.6) bakteri *B. mallei* dalam basis data bank gen NCBI (GenBank®). Tujuan penelitian ialah mengarakterisasi, mengkloning, dan mengekspresikan gen penyandi enzim glukanaase subunit 48 kDa dari bakteri *Bcc* isolat BiogenCC E76 menggunakan sistem pengekspresian *Escherichia coli*.

BAHAN DAN METODE

Strain Bakteri

Plasmid pGEM-Glu yang membawa gen glukanaase dari *Bcc* diperoleh dari hasil penelitian Winangsih et al. (2014) yang dikoleksi di Laboratorium Biokimia, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor. Plasmid ekspresi pET-32b (Novagen, AS) dan bakteri *E. coli* strain BL21(DE3)-pLys yang kompatibel dengan sistem ekspresi pET-32b digunakan dalam penelitian ini.

Subkloning Gen β -1,3-Glukanase dalam Vektor Ekspresi

Proses subkloning gen β -1,3-glukanase ke vektor ekspresi pET-32b dilakukan dengan mengamplifikasi gen glukonase dari plasmid pGEM-Glu dengan primer GluB-F (GATGGGATCCGGGCGAGCTTCTCG) dan GluH-R (TCAAGCTTCGGGCGTCGAGCAC). Kedua primer tersebut mengandung situs pemotongan enzim restriksi *Bam*HI dan *Hind*III. Fragmen hasil PCR dipurifikasi dan diligasasi ke *pGEM®-T Easy* untuk mendapatkan plasmid rekombinan pGEM-GluBH yang kemudian ditransformasikan ke dalam *E. coli* DH5 α . Klon *E. coli* yang positif membawa plasmid pGEM-GluBH diperbanyak dan plasmid pGEM-GluBH diekstraksi untuk subkloning. Subkloning didahului dengan pemotongan plasmid pGEM-GluBH dan pET-32b dengan enzim *Bam*HI dan *Hind*III. Fragmen gen glukonase dari plasmid pGEM-GluBH dan pET-32b yang telah linier kemudian dipurifikasi dengan *DNA Gel Extraction Kit* (QIAGEN, AS). Selanjutnya, fragmen gen glukonase diligasi dengan plasmid pET-32b dan ditransformasi ke dalam *E. coli* DH5 α untuk menghasilkan plasmid ekspresi pET-Glu. Ekspresi glukonase dalam plasmid tersebut dilakukan dengan mentransformasi pET-Glu ke dalam *E. coli* BL21(DE3)-*pLyss*. Seleksi klon *E. coli* pembawa plasmid pET-Glu dilakukan pada media *Luria Bertani* (LB) agar yang mengandung antibiotik ampisilin dan kloramfenikol.

Ekspresi β -1,3-Glukanase Rekombinan

Klon *E. coli* BL21(DE3)-*pLyss* pembawa plasmid pET-Glu ditumbuhkan pada 2 ml media LB cair yang mengandung antibiotik ampisilin dan kloramfenikol sebagai *starting culture*. Biakan diinkubasi pada suhu ruangan sambil digoyang 75 rpm selama 18 jam. Sebanyak 50 μ l biakan tersebut kemudian disubkultur pada 10 ml media LB yang mengandung antibiotik yang sama dan diinkubasikan dengan digoyang 75 rpm pada suhu ruangan. Setelah mencapai OD₆₀₀ = 0,5 (sekitar 6 jam setelah inkubasi), biakan diinduksi dengan *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) 0,1 mM/ml dan diinkubasi kembali pada kondisi yang sama hingga 18 jam. Selanjutnya, sel bakteri dipanen dengan sentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit dan protein rekombinan yang terekspresi diekstraksi dengan *BugBuster® Protein Extraction Reagent* (Novagen, AS) yang mengandung lisogenase (Benzonase) sesuai protokol yang diberikan. Setiap pelet sel bakteri yang berasal dari 30 ml biakan diekstraksi dengan 5 ml *protein extraction reagent* dan divorteks hingga sel bakteri tersuspensi sempurna. Suspensi bakteri diinkubasikan pada suhu ruangan selama 20 menit sambil digoyang sebelum disentrifu-

gasi 16.000 $\times$ g pada 4°C selama 20 menit. Pelet dan supernatan dipisahkan untuk dianalisis profil proteinnya dengan *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) 12% dan digunakan untuk purifikasi protein. Profil protein pada gel divisualisasi dengan pewarnaan (*staining*) menggunakan *Coomassie® Brilliant Blue R-250*. Penanda (*marker*) protein yang digunakan ialah *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa* (ThermoFisher Scientific, AS).

Purifikasi β -1,3-Glukanase Rekombinan

Purifikasi protein dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi afinitas resin Ni-NTA (Co-Talon). Sebanyak 1 ml resin Ni-NTA diseimbangkan dengan bufer fosfat pH 7,4 yang mengandung natrium fosfat 20 mM dan NaCl 500 mM. Selanjutnya, 5 ml supernatan protein dicampurkan dengan resin di dalam tabung Falcon dan digoyang 150 rpm selama 60 menit. Campuran dimasukkan ke dalam kolom (0,8 cm $\times$ 20 cm) hingga memadat. Setelah keran kolom dibuka, filtrat yang keluar ditampung dan kolom dicuci dengan bufer pencuci (natrium fosfat 20 mM, NaCl 500 mM). Protein rekombinan yang terperangkap di dalam resin elusi dengan 3 ml bufer yang mengandung natrium fosfat 20 mM, NaCl 500 mM, dan imidazole 500 mM. Setiap fraksi hasil elusi masing-masing ditampung sebanyak 0,5 ml di dalam tabung mikro 1,5 ml. Fraksi hasil elusi diukur konsentrasi proteinnya dengan reagen Bradford menggunakan spektrofotometer (panjang gelombang 595 nm) untuk mengetahui fraksi protein rekombinan yang paling tinggi.

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Elektroforesis protein dilakukan dengan menggunakan gel poliakrilamid *discontinuous* yang terdiri atas gel pemisah (*separating*) dan gel penutup (*stacking*). Gel pemisah dibuat dengan konsentrasi akrilamid 12% yang terdiri atas bahan-bahan sebagai berikut: 4 ml akrilamid/bis 30%, 2,5 ml Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 100 μ l SDS 10%, 5 μ l *N, N, N', N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED), 50 μ l *ammonium persulfate* (APS) 10%, dan 3,35 ml akuades. Gel penutup dibuat dengan konsentrasi akrilamid 4% yang terdiri atas 1,33 ml akrilamid/bis 30%, 2,5 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 100 μ l SDS 10%, 10 μ l TEMED, 50 μ l APS 10%, dan 6,1 ml akuades. Gel yang telah memadat direndam dalam bufer Tris-glisin 1 $\times$ di dalam tangki elektroforesis. Sampel protein yang akan dielektroforesis dicampur dengan bufer Laemmli (Tris-HCl pH 6,8, *bromophenol blue*, SDS

10%, gliserol, dan β -mercaptoethanol) dengan perbandingan 1:1, kemudian didenaturasi pada air mendidih selama 10 menit. Sampel yang telah terdenaturasi dimasukkan ke dalam sumur gel dan dielektroforesis dengan voltase 120 volt selama 90 menit. Visualisasi protein dalam gel dilakukan dengan pewarnaan *Coomassie® Brilliant Blue R-250* 1% dalam bufer yang mengandung metanol 60% dan asam asetat glasial 12%. Profil protein terlihat setelah dilakukan penghilangan warna (*destaining*) *Coomassie® Brilliant Blue* dalam gel dengan bufer pencuci yang mengandung metanol 10% dan asam asetat glasial 10%.

Pengukuran Aktivitas β -1,3-Glukanase

Pengukuran aktivitas glukukanase dengan metode *Dinitrosalicylic acid* (DNS) (Ghose 1987) dengan modifikasi. Sebanyak 50 μ l enzim β -1,3-glukanase rekombinan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 250 μ l glukukan 0,5% dan 200 μ l bufer fosfat pH 4,8 hingga volume akhir campuran 500 μ l. Campuran ditutup dengan *aluminum foil* kemudian divorteks. Selanjutnya, campuran diinkubasi pada 48°C selama 60 menit dan dipanaskan pada 100°C selama 10 menit untuk menghentikan reaksinya. Campuran ditambah reagen DNS sebanyak 1,5 ml lalu dipanaskan pada 100°C selama 15 menit. Campuran didinginkan selama 20 menit dan serapannya dibaca pada panjang gelombang 575 nm. Pengukuran dilakukan secara triplo. Bufer lisis digunakan sebagai blanko. Nilai konsentrasi gula pereduksi diperoleh dari konversi nilai absorbansi yang terbaca melalui kurva standar glukosa (Merck). Satu unit aktivitas enzim glukukanase sebanding dengan satu μ mol glukosa yang dihasilkan per menit, dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Unit} = \frac{[\text{glukosa}] \text{ (ppm)}}{\text{waktu inkubasi} \times \text{BM glukosa} \times V \text{ enzim (ml)}} \times FP$$

Persamaan 1

Aktivitas spesifik enzim dihitung dengan rumus:

$$\text{Unit/mg} = \frac{\text{Aktivitas unit (unit/ml)}}{\text{Kadar protein (mg/ml)}}$$

Persamaan 2

Penentuan Suhu dan pH Optimum Aktivitas dan Stabilitas β -1,3-Glukanase

Suhu optimal yang dibutuhkan untuk reaksi enzimatik dicari dengan cara mengukur aktivitas enzim glukukanase pada suhu yang bervariasi (10, 20, 30, 40, 50, 60°C) pada kondisi pH 4,8. Cara pengukuran aktivitas enzim sama seperti standar pengukuran

sebelumnya. Suhu yang menghasilkan aktivitas tertinggi ditetapkan sebagai suhu optimum. Sementara, pengaruh pH terhadap aktivitas glukukanase dilakukan pada kisaran pH 3,0–9,0 dengan konsentrasi bufer 50 mM pada suhu optimum. Jenis bufer yang digunakan ialah sodium sitrat (pH 3,0–6,0), sodium fosfat (pH 7,0), dan Tris-HCl (pH 8,0–9,0). Nilai pH yang menghasilkan aktivitas tertinggi ditetapkan sebagai pH optimum. Setiap perlakuan suhu dan pH diulang sebanyak tiga kali.

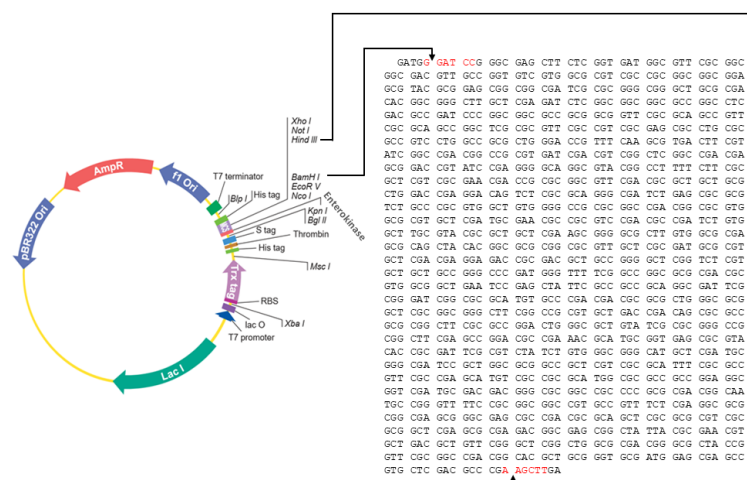
Stabilitas enzim glukukanase terhadap suhu diukur dengan cara menginkubasikan larutan enzim selama 1 jam pada suhu yang bervariasi (10, 20, 30, 40, 50, 60°C), segera setelah inkubasi larutan enzim didinginkan dengan cepat dan aktivitas enzim diukur dengan cara yang sama dan nilainya dinyatakan dalam persen terhadap aktivitas enzim tanpa perlakuan sebagai aktivitas relatif. Prosedur yang sama dilakukan untuk uji stabilitas enzim glukukanase terhadap pH.

HASIL DAN PEMBAHASAN

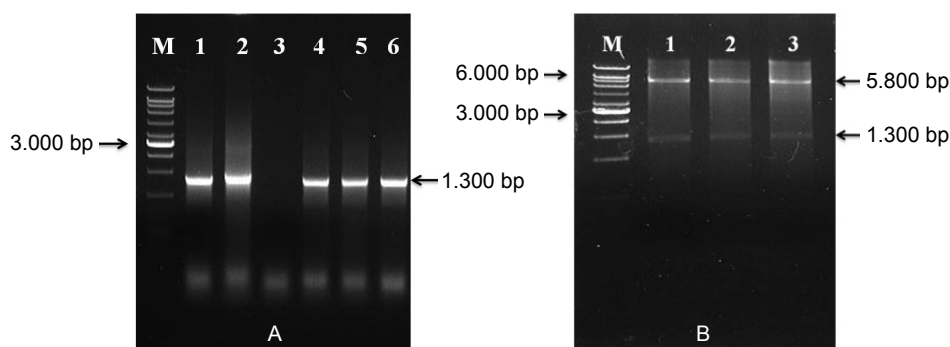
Konstruksi Gen β -1,3-Glukanase dalam Vektor Ekspresi

Posisi ligasi gen β -1,3-glukanase dalam vektor ekspresi pET-32b berada pada situs pemotongan *Bam*HI dan *Hind*III pada bagian *multiple cloning site* (MCS) (Gambar 1). Pemilihan situs pemotongan *Bam*HI dan *Hind*III didasarkan pada ada tidaknya situs pemotongan enzim tersebut di urutan nukleotida gen β -1,3-glukanase. Namun, untuk meligasikan pada situs tersebut, urutan nukleotida gen β -1,3-glukanase ditambah dengan *adaptor site Bam*HI dan *Hind*III pada ujung 5' dan 3'. Penambahan *adaptor site* dilakukan dengan menggunakan primer yang mengandung nukleotida untuk enzim restriksi *Bam*HI di bagian *forward* dan *Hind*III di bagian *reverse* pada proses amplifikasi gen β -1,3-glukanase pada plasmid pGEM-Glu.

Gambar 2 menunjukkan hasil ligasi gen β -1,3-glukanase dalam plasmid pET-32b yang menghasilkan konstruk plasmid pET-Glu dengan ukuran ~7,1 kb. Dari hasil seleksi PCR terhadap koloni bakteri *E. coli* strain DH5 α yang ditransformasi dengan plasmid pET-Glu diperoleh beberapa klon positif membawa plasmid tersebut. Hasil analisis restriksi terhadap plasmid pET-Glu dengan enzim *Bam*HI dan *Hind*III terkonfirmasi adanya sisipan gen β -1,3-glukanase berukuran ~1.300 bp dan vektor berukuran ~5,8 kb sehingga memastikan gen β -1,3-glukanase terligasi pada situs yang tepat dalam vektor pET-32b.



Gambar 1. Konstruk ekspresi gen β -1,3-glukanase dalam vektor pET-32b(+).



Gambar 2. Visualisasi gel elektroforesis plasmid rekombinan pET-Glu dan hasil pemotongannya dengan enzim restriksi. (A) Hasil PCR koloni klon bakteri pembawa plasmid pET-Glu. (B) Hasil pemotongan plasmid pET-Glu dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Hind*III. M = marker DNA 1 kb. Lajur 1–6: plasmid rekombinan pET-Glu.

Posisi gen β -1,3-glukanase pada situs pemotongan *Bam*HI dan *Hind*III dalam pET-32b(+) diapit oleh gen penyandi *soluble protein thioredoxin* (Trx-tag), *6 $\times$ Histidine-tag* (His-tag), dan *subtilisin-tag* (S-tag) pada ujung 5' serta His-tag pada ujung 3'. Dengan demikian, total urutan nukleotida rekombinan gen β -1,3-glukanase dalam plasmid pET-32b(+) mulai dari *start codon* berukuran 1.842 bp yang terdiri atas 531 bp urutan fusi dari vektor dan 1.311 bp gen β -1,3-glukanase. Kedua urutan tersebut mengodekan protein fusi berukuran ~17 kDa dan glukonase ~48,3 kDa. Ekspresi gen β -1,3-glukanase pada konstruk tersebut dikendalikan oleh promotor T7 dengan *start codon* gen Trx-tag. Gen Trx-tag yang difusikan dengan gen yang akan diekspresikan dalam sistem pET-32b berfungsi untuk meningkatkan kelarutan protein rekombinan sehingga mudah untuk diekstraksi dan dimurnikan. Sementara, His-tag dan S-tag berfungsi untuk memudahkan dalam purifikasi dan deteksi protein rekombinan (Terpe 2003).

Ekspresi dan Purifikasi β -1,3-Glukanase Rekombinan

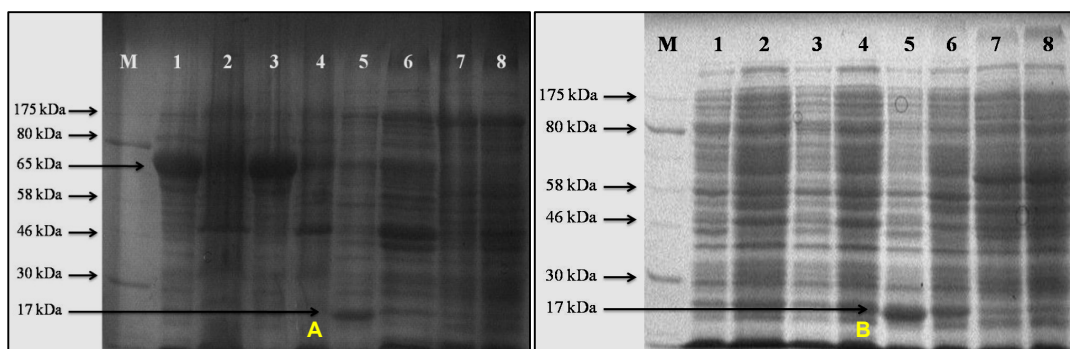
Ekspresi gen β -1,3-glukanase pada plasmid rekombinan pET-Glu yang menggunakan sistem ekspresi *E. coli* BL21(DE3)-*pLyss* diinduksi oleh IPTG. *E. coli* BL21(DE3)-*pLyss* merupakan strain bakteri yang biasa digunakan untuk ekspresi gen-gen yang dikonstruksi dalam vektor yang dikendalikan oleh promotor T7. Strain ini membawa gen DE3 lisogen yang memiliki bagian imunitas *phage 21*, gen *lacI*, dan promotor *lacUV5* yang mengendalikan ekspresi kaset gen T7 *RNA polymerase* di DNA kromosomnya (Studier dan Moffatt 1986). Ketika bakteri diinduksi dengan IPTG, promotor *lacUV5* diaktivasi dan menyebabkan over-ekspresi T7 *RNA polymerase* sehingga gen target yang dikendalikan oleh promotor T7 dalam plasmid pET akan terekspresi. BL21(DE3)-*pLyss* juga merupakan strain bakteri yang telah kehilangan aktivitas enzim protease Lon yang dapat mendegradasi protein-protein yang diekspresikannya (Sørensen dan Mortensen 2005). Oleh karena itu,

strain BL21(DE3)-*pLyss* dapat menghasilkan over-ekspresi protein rekombinan yang ditargetkan.

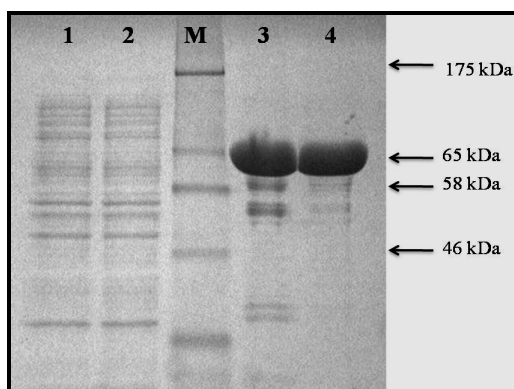
Hasil over-ekspresi dua klon strain *E. coli* rekombinan pembawa pET-Glu disajikan pada Gambar 3. Over-ekspresi protein berukuran ~65 kDa terdeteksi pada biakan yang diinduksi dengan IPTG, sedangkan biakan yang tidak diinduksi IPTG tidak menunjukkan ekspresi protein dengan ukuran tersebut (Gambar 3A). Bobot molekul protein tersebut sesuai dengan ukuran protein rekombinan yang ditargetkan dalam konstruk pET-Glu. Pada ekstrak protein dari bakteri yang tidak membawa plasmid pET-32b tidak terdeteksi adanya protein berukuran ~65 kDa, sedangkan pada ekstrak protein *E. coli* yang membawa plasmid pET-32b terdeteksi adanya protein berukuran 17 kDa sebagai protein Trx-tag. Protein berukuran ~65 kDa juga hanya terdeteksi pada bagian supernatan hasil ekstraksi protein dari sel bakteri, bukan pada bagian peletnya (Gambar 3B). Hal ini menunjukkan bahwa protein rekombinan tersebut ter-ekspresi pada bagian periplasma, bukan pada badan inklusi sel bakteri (Novagen 2006) sehingga ketika di-

ekstraksi dengan bufer lisis mudah terlarut dalam supernatan.

Hasil purifikasi β -1,3-glukanase rekombinan dengan kolom histidin menggunakan metode afinitas kromatografi disajikan pada Gambar 4. Pita protein berukuran ~65 kDa berhasil dimurnikan dari protein lainnya. Protein β -1,3-glukanase rekombinan berfusi dengan residu His-tag pada ujung C- dan N-terminal asam aminonya sehingga memiliki afinitas dengan resin yang mengandung ion nikel (Ni^{2+}) yang telah diimmobilisasi pada *nitrilotriacetic acid* (NTA) (Khan et al. 2006). Ketika suspensi protein rekombinan yang mengandung histidin dialirkan pada kolom yang mengandung ion nikel (Ni^{2+}), asam-asam amino His-tag akan terikat pada ion tersebut, sedangkan protein lainnya akan lewat. Ikatan rekombinan β -1,3-glukanase dengan Ni^{2+} akan terlepas jika dielusi dengan larutan imidazole konsentrasi tinggi, yaitu 100–500 mM, sehingga yang terlarut dalam imidazole adalah protein β -1,3-glukanase rekombinan saja. Hal ini ditunjukkan dari hasil analisis dengan SDS-PAGE, terlihat adanya pita protein yang sangat tebal dengan



Gambar 3. Hasil SDS-PAGE sampel sel bakteri *E. coli* rekombinan yang membawa plasmid pET-Glu. (A) Supernatan sel bakteri rekombinan. (B) Pelet sel bakteri rekombinan. M = marker protein. Lajur 1: rekombinan 1 diinduksi IPTG, lajur 2: rekombinan 1 tanpa induksi, lajur 3: rekombinan 2 diinduksi, lajur 4: rekombinan 2 tanpa induksi, lajur 5: DE3 membawa pET diinduksi, lajur 6: DE3 membawa pET tanpa induksi, lajur 7: DE3 diinduksi, lajur 8: DE3 tanpa induksi.



Gambar 4. Profil hasil purifikasi glukonase menggunakan kolom histidin. M = marker protein. Lajur 1 dan 2: sampel protein yang tidak terjerap dalam kolom, lajur 3 dan 4: sampel protein glukonase rekombinan yang terjerap dalam kolom.

ukuran ~65 kDa sesuai target, sedangkan pada filtrat hasil penyaringan (*flowthrough*) tidak lagi mengandung protein berukuran ~65 kDa.

Karakteristik Enzim β -1,3-Glukanase Rekombinan

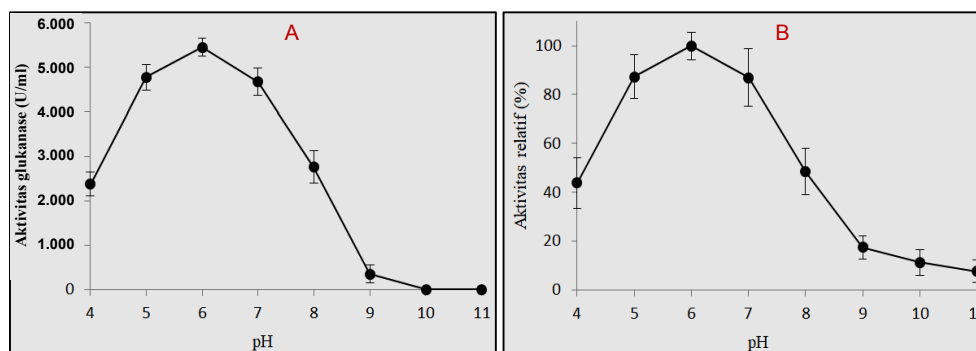
Hasil uji aktivitas enzim murni β -1,3-glukanase rekombinan ditunjukkan pada Tabel 1. Aktivitas spesifik β -1,3-glukanase rekombinan hasil purifikasi mencapai 1.207,976 U/mg dari produk protein yang hanya 27% dari ekstrak protein kasar total. Aktivitas spesifik β -1,3-glukanase rekombinan murni ini meningkat 3,9 kali lebih tinggi dibanding dengan ekstrak kasarnya (*crude*) yang hanya sebesar 303,026 U/mg. Aktivitas spesifik β -1,3-glukanase rekombinan ini juga lebih tinggi dibanding dengan enzim β -1,3-glukanase rekombinan dari supernatan kultur *B. cepacia* seperti yang dilaporkan pada penelitian sebelumnya, $5,7 \times 10^{-2}$ U/mg (Manzila et al. 2015). Hal ini menunjukkan bahwa kloning dan ekspresi gen β -1,3-glukanase *B. cepacia* pada *E. coli* tidak menimbulkan pengaruh negatif terhadap aktivitas enzim yang dihasilkannya. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Pandey et al.

(2014) yang melakukan kloning dan ekspresi gen β -1,4-endoglukanase dari *B. subtilis* ke dalam *E. coli*. Beberapa fusi protein dalam β -1,3-glukanase rekombinan, seperti Trx-tag, His-tag, dan S-tag, tidak memengaruhi aktivitas enzim (Paraskevopoulou dan Falcone 2018).

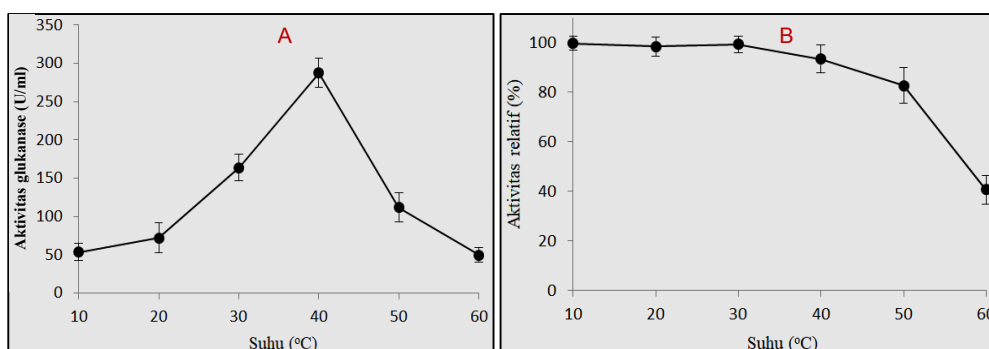
Gambar 5 menunjukkan bahwa β -1,3-glukanase rekombinan memiliki aktivitas optimal pada pH 5–7. Di luar kondisi pH tersebut, aktivitas dan stabilitas β -1,3-glukanase rekombinan akan menurun. Hasil ini sesuai dengan beberapa hasil penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa pH optimal aktivitas glukonase dari bakteri berkisar antara 6,0–7,5, tetapi untuk glukonase dari jamur kondisi pH optimalnya sangat bervariasi. Glukanase dari bakteri *P. aeruginosa* C32a (Suryadi et al. 2014) dan *Pseudomonas* sp. CL3 (Cheng dan Chang 2011) memiliki aktivitas optimal pada pH 6, sedangkan glukonase dari jamur *Paceilomyces thermophila*, *Rhizopus microsporus*, dan *Laetiporus sulphureus* berturut-turut memiliki aktivitas optimal pada pH 7, 5, dan 4 (Celestino et al. 2006; Hong et al. 2009; Hua et al. 2010). Aktivitas tinggi

Tabel 1. Hasil uji aktivitas spesifik β -1,3-glukanase rekombinan.

Tahapan	Volume (ml)	Aktivitas total (U)	Protein total (mg)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Kemurnian (kali)	Hasil (%)
Ekstraksi	6,00	15.090,68	49,8	303,026	1,0	100
Purifikasi	0,75	4.076,92	3,4	1.207,976	3,9	27



Gambar 5. Optimasi pH terhadap aktivitas β -1,3-glukanase (A) dan aktivitas relatif enzim (B).



Gambar 6. Optimasi suhu terhadap aktivitas glukonase (A) dan aktivitas relatif enzim (B).

enzim pada kondisi pH optimum dapat terjadi karena asam-asam amino yang berada di sisi aktif enzim akan mengalami ionisasi secara maksimal untuk membentuk kompleks ikatan enzim-substrat dalam proses hidrolisis (Byrt et al. 2012).

Aktivitas β -1,3-glukanase rekombinan juga sangat dipengaruhi oleh faktor suhu. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim β -1,3-glukanase rekombinan dapat dilihat pada Gambar 6. Aktivitas β -1,3-glukanase rekombinan akan meningkat berbanding lurus dengan meningkatnya suhu hingga mencapai suhu optimumnya, kemudian aktivitas enzim akan menurun setelah melewati suhu optimumnya. Aktivitas tertinggi terjadi pada suhu 40°C, sedangkan stabilitas enzim berada pada suhu 10–50°C dengan tingkat aktivitas relatif >80%. Namun, pada suhu >60°C enzim menjadi sangat tidak stabil. Kondisi suhu optimum yang sama juga dilaporkan untuk aktivitas β -1,3-glukanase dari *B. subtilis* NSRS 89–24 (Leelasuphakul et al. 2006), *R. solani* (Vijayendra dan Kashiwagi 2009), serta *Agaricus brasiliensis* ATCC 76739 (Shu dan Xu 2007).

Keberhasilan kloning, ekspresi, dan karakterisasi β -1,3-glukanase rekombinan dari *Bcc* dalam sistem *E. coli* akan sangat penting untuk mempelajari mekanisme bakteri endofitik *Bcc* dalam menghambat infeksi jamur patogen tanaman. Dengan menggunakan β -1,3-glukanase rekombinan, proses pelisisan dinding sel jamur patogen akan lebih mudah dipelajari. Demikian juga dengan hasil hidrolisisnya berupa senyawa glukana yang dapat berfungsi sebagai elisitor akan lebih mudah dimurnikan dan diaplikasikan.

KESIMPULAN

Gen penyandi enzim β -1,3-glukanase dari *B. cepacia* telah dikonstruksi pada vektor ekspresi pET-32b dan ditransformasikan ke strain *E. coli* BL21(DE3)-pLyss. Gen β -1,3-glukanase yang terfusi dengan Trx-tag, His-tag, dan S-tag telah diekspresikan secara berlebih pada *E. coli* dan menghasilkan enzim β -1,3-glukanase rekombinan berukuran ~65 kDa. Enzim ini terekspresikan pada periplasma sehingga terlarut pada bufer ekstraksi. Protein rekombinan ini telah dimurnikan dan diuji aktivitasnya yang menunjukkan aktivitas optimal pada suhu 40°C dan pH 5–7. Enzim β -1,3-glukanase rekombinan yang memiliki aktivitas spesifik sangat tinggi menunjukkan bahwa fusi Trx-tag, His-tag, dan S-tag tidak memengaruhi aktivitas enzimnya. Kajian pemisahan fusi protein tersebut dari β -1,3-glukanase rekombinan dan studi lebih mendalam aktivitas enzim β -1,3-glukanase dan

produk hidrolisisnya perlu dilakukan berturut-turut untuk mendapatkan enzim yang murni dan mengetahui peranan bakteri endofitik *B. cepacia* dalam interaksinya dengan tanaman dan jamur patogen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan dengan dana DIPA APBN BB Biogen, Balitbangtan, Kementan TA 2013. Penulis mengucapkan terima kasih kepada tim peneliti, mahasiswa, dan dosen pembimbing atas dukungan, keterlibatan, dan kerja samanya dalam pelaksanaan penelitian ini.

KONTRIBUTOR PENULISAN

TPP: kontributor utama, penanggung jawab penelitian, dan pembimbing tesis; FW: mahasiswa S2 IPB, melakukan kloning dan ekspresi gen glukanase serta analisis aktivitas enzim; IM: kontributor anggota, membantu purifikasi protein dengan kromatografi kolom; MB: pembimbing tesis IPB, melakukan koreksi dan perbaikan penulisan.

DAFTAR PUSTAKA

- Akita, M., Kayatama, K., Hatada, Y., Ito, S. & Horikoshi, K. (2005) A novel β -glucanase gene from *Bacillus halodurans* C-125. *FEMS Microbiology Letters*, 248 (1), 9–15.
- Aziz, A., Poinssot, B., Daire, X., Adrian, M., Bézier, A., Lambert, B., Joubert, J.M. & Pugin, A. (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16 (12), 1118–1128.
- Boaisha, O.B. (2012) *Burkholderia cepacia* complex bacteria and their antimicrobial activity. *Disertation*, Cardiff University, 258 pp.
- Byrt, C.S., Cahyanegara, R. & Christopher, P.L. (2012) Plant carbohydrate binding module enhances activity of hybrid microbial cellulase enzyme. *Frontier in Plant Science*, 3 (254), 1–8.
- Celestino, K.R.S., Cunha, R.B. & Felix, C.R. (2006) Characterization of a β -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochemistry*, 7, 23–31.
- Chaari, F., Kamoun, A., Bihri, F., Bibech, M., Ellouze-Ghrobel, R. & Ellouz-Chaabouni, S. (2012) Statistical optimization for the production of lichenase by a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF in solid state fermentation using pea pomace as a novel solid support. *Industrial Crops and Products*, 40 (1), 192–198.

- Chen, L., Zhang, Q.Y., Jia, M., Ming, Q.L., Yue, W. & Rahman K. (2016) Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. *Critical Review Microbiology*, 42, 454–473.
- Cheng, C.L. & Chang, J.S. (2011) Hydrolysis of lignocellulosic feedstock by novel cellulases originating from *Pseudomonas* sp. CL3 for fermentative hydrogen production. *Bioresources Technology*, 102 (18), 3828–3864.
- de los Santos-Villalobos, S., Barrera-Galicia, G.C., Miranda-Salcedo, M.A. & Jose, J. (2012) *Burkholderia cepacia* XXVI siderophore with biocontrol capacity against *Colletotrichum gloeosporioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 (8), 2615–2623.
- Dikin, A., Kamaruzaman, S., Jugah, K. & Idris, A.S. (2007) Effect of different carbon sources and peptones on the production of antimicrobial substances from bacteria against *Schizophyllum commune* FR. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9, 49–52.
- Fliegmann, J., Mithofer, A., Wanner, G. & Ebel, J. (2004). An ancient enzyme domain hidden in the putative β -glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (2), 1132–1140.
- Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, 59 (2), 257–268.
- Hong, M.R., Kim, Y.S., Joo, A.R., Lee, J.K. & Kim, Y.S. (2009) Purification and characterization of a thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19 (8), 818–822.
- Hua, C., Yan, Q., Jiang, Z., Li, Y. & Katrolia, P. (2010) High-level expression of a specific beta-1,3-1,4-glucanase from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 88, 509–518.
- Inui, H., Yamaguchi, Y. & Hirano, S. (1997) Elicitor actions of N-Acetyl chito oligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61 (6), 975–978.
- Kadir, J., Rahman, M.A., Mammud, T.M.M., Abdul Rahman, R. & Begum, M.M. (2008) Extraction of antifungal substances from *Burkholderia cepacia* with antibiotic activity against *Colletotrichum gloeosporioides* on papaya (*Carica papaya*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 10, 15–20.
- KEEG (2019) Enzyme EC.3.2.1.6. Available at: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:3.2.1.6 f [Accessed 26 April 2019].
- Khan, F., He, M. & Taussig, M.J. (2006) Double-hexahistidine tag with high-affinity binding for protein immobilization, purification, and detection on Ni-nitrilotriacetic acid surfaces. *Analytical Chemistry*, 78 (9), 3072–3079.
- Kobayashi, T., Uchimura, K., Kubota, T., Nunoura, T. & Deguchi, S. (2016) Biochemical and genetic characterization of β -1,3 glucanase from a deep subseafloor *Laceyella putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (1), 203–214.
- Larroque, M., Barriot, R., Barre, A., Rouge, P., Dumas, B. & Gaulin, E. (2012) The unique architecture and function of cellulose interacting protein in *Oomycetes* revealed by genomic and structural analyses. *BMC Genomics*, 13 (1), 1–5.
- Lee, C.H., Kim, M. & Kim, H. (2006) An antifungal property of *Burkholderia ambifaria* against phytopathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16 (3), 465–468.
- Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P. & Phongpaichit, S. (2006) Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. *Enzyme and Microbial Technology*, 38 (7), 990–997.
- Li, W., Roberts, D.P., Dery, P.D., Meyer, S.L.F., Lohrke, S., Lumsden, R.D. & Hebbar, K.P. (2002) Broad spectrum anti-biotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F. *Crop Protection*, 21, 129–135.
- Manzila, I., Priyatno, T.P., Fathin, M.F., Ambarsari, L., Suryadi, Y., Sanudra, I.M. & Susilowati, D.N. (2015) Karakterisasi β -1,3-1,4-glukanase bakteri endofitik *Burkholderia cepacia* isolat E76 asal tanaman padi. *Berita Biologi*, 14 (2), 143–153.
- Ménard, R., Alban, S., de Ruffray, P., Jamois, F., Franz, G., Fritig, B., Jean-Claude, Y. & Kauffmann, S. (2004) β -1,3 glucan sulfate, but not β -1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and arabidopsis. *Plant Cell*, 16 (11), 3020–3032.
- Mishra, A.K., Sharma, K. & Misra, R.S. (2012) Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of Plant Interactions*, 7 (2), 95–120.
- Narasimhan, A., Bist, D., Suresh, S. & Shivakumar, S. (2013) Optimization of mycolytic enzymes (chitinase, β -1,3-glucanase, and cellulase) production by *Bacillus subtilis*, a potential biocontrol agent using one-factor approach. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 72 (3), 172–178.
- Novagen (2006) *pET System Manual*. EMD Biosciences, an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt: Germany, 80 pp.
- Pandey, S., Kushwah, J., Tiwari, R., Kumar, R., Somvanshi, V.S., Nain, L. & Saxena, A.K. (2014) Cloning and expression of β -1,4-endoglucanase gene from *Bacillus subtilis* isolated from soil long term irrigated with effluents of paper and pulp mill. *Microbiological Research*, 169 (9–10), 693–698.

- Paraskevopoulou, V. & Falcone, F. (2018) Polyionic tags as enhancers of protein solubility in recombinant protein expression. *Microorganisms*, 6 (2), 47–61.
- Parke, J.L. & Gurian-Sherman, D. (2002) Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review of Phytopathology*, 39 (1), 225–258.
- Pitson, S.M., Seviour, R.J. & McDougall, B.M. (1993) Noncellulolytic fungal β -glucanases: Their physiology and regulation. *Enzyme Microbial Technology*, 5, 178–192.
- Robinson, S.M. & Bostock, R.M. (2015) β -glucans and eicosapolyenoic acids as MAMPs in plant–oomycete interactions: Past and present. *Plant-Microbe Interactions*, 5 (797), 1–10.
- Shetty, N.P., Jens, D.J., Anne, K., Christine, F., Naomi, G., Andreas, B., David, B.C. & Hans, J.L.J. (2009) Effects of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60 (15), 4287–4300.
- Shoresh, M., Harman, G.E. & Mastouri, F. (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48 (1), 21–43.
- Shu, C.H. & Xu, C.J. (2007) Medium optimization for producing bioactive exopolysaccharides by *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (= *A. blazei* Murrill ss. Heinem) in submerged culture. *Food Technology and Biotechnology*, 45 (3), 327–333.
- Sørensen, H.P. & Mortensen, K.K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 115, 113–128.
- Sriram, S., Manasa, S.B. & Savitha, M.J. (2009) Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. *Journal of Biological Control*, 23 (4), 449–456.
- Studier, F.W. & Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189, 113–130.
- Suryadi, Y., Susilowati, D.N., Lestari, P., Priyatno, T.P., Samudra, I.M., Hikmawati, N. & Mubarik, N.R. (2014) Characterization of bacterial isolates producing chitinase and glucanase for biocontrol of plant fungal pathogens. *Journal of Agricultural Technology*, 10 (4), 983–999.
- Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60 (5), 523–533.
- Vijayendra, S.V.N. & Kashiwagi, Y. (2009) Characterization of a new acid stable exo- β -1,3-glucanase of *Rhizoctonia solani* and its action on microbial polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44 (1), 92–97.
- Winangsih, F., Bintang, M. & Priyatno, T.P. (2014) Kloning gen β -1,4 glukonase dari *Burkholderia cepacia* ke dalam *Escherichia coli* dan karakterisasi urutannya. *Current Biochemistry*, 1 (3), 116–125.
-