

Konstruksi Pustaka Metagenom Prokariot Dari Permukaan Eucheuma Cottonii Untuk Mencari Gen Penyandi K-Karaginase

Zahrotun Nafisah^{1*}, Afaf Baktir², Zimon Pereiz³
Universitas Palangka Raya Kalimantan, Indonesia^{1,3}
Universitas Airlangga Surabaya, Indonesia²
Email: nafisah@chem.upr.ac.id

*Correspondence

INFO ARTIKEL

Diterima : 27-04-2023
Direvisi : 29-04-2023
Disetujui : 30-04-2023

Kata kunci: κ -karaginase;
Eucheuma cottonii;
metagenomik.

ABSTRAK

κ -Karaginan adalah koloid hidrofilik yang diekstrak dari makroalga *Eucheuma cottonii*. κ -karaginan mempunyai berat molekul yang sangat besar sehingga pemanfaatannya terbatas. Namun, dalam bentuk Carrageenan Oligosaccharide (COs), κ -karaginan mempunyai aktivitas fisik dan biologi yang bervariasi, termasuk anti tumor, anti oksidan dan anti angiogenik. Enzim κ -karaginase berperan memutus ikatan β -(1,4) pada κ -karaginan untuk menghasilkan κ -COs (κ -carrageenan oligosaccharide). Ada berbagai macam bakteri yang hidup di permukaan *Eucheuma cottonii*, namun hanya ada 1% bakteri yang dapat dikultur. Metode alternatif untuk eksplorasi bakteri di alam adalah metode metagenomik. Dalam penelitian ini dilakukan eksplorasi gen κ -karaginase dari DNA metagenom prokariot yang menempel di permukaan *Eucheuma cottonii*. Konstruksi pustaka metagenom prokariot dilakukan terhadap kumpulan fragmen DNA hasil digesti dengan enzim restriksi SfiI. Kemudian fragmen DNA diligasi dengan fag λ TriplEx2 dan dilakukan penentuan titer. Titer tertinggi didapatkan dari campuran ligasi dengan perbandingan DNA dan fag yaitu 3:2 sebesar $10,3 \times 10^7$. Kemudian plak positif diekspresikan melalui *E.coli* BM25,8 untuk mencari gen penyandi enzim κ -karaginase. Aktivitas positif enzim κ -karaginase ditandai dengan terbentuknya daerah halo. Kemudian klon rekombinan yang membentuk halo dikultivasi untuk produksi enzim κ -karaginase, dan diuji aktivitasnya untuk menentukan suhu dan pH optimum. Berdasarkan uji aktivitas ekstrak κ -karaginase terhadap suhu dan pH didapatkan 4 profil suhu dan pH optimum yang berbeda, dengan demikian telah didapatkan 4 macam gen penyandi enzim κ -karaginase.

Keywords: κ -caraginas;,
Eucheuma cottonii;
metagenomics.

ABSTRACT

κ -Carrageenan is a hydrophilic colloid extracted from the macroalga *Eucheuma cottonii*. κ -carrageenan has a very large molecular weight so its utilization is limited. However, in the form of Carrageenan Oligosaccharide (COs), κ -carrageenan has varied physical and biological activities, including anti-tumor, anti-oxidant and anti-angiogenic. The enzyme κ -carrageinase breaks the β -(1,4) bond in κ -carrageenan to produce κ -COs (κ -carrageenan oligosaccharide). There is a wide variety of bacteria living on the surface of *Eucheuma cottonii*, but only 1% of bacteria can be cultured. An alternative method for the exploration of bacteria in nature is the metagenomic method. In this study, the κ -carcinase gene was explored from the DNA of the prokaryotic metagenome attached to the surface of *Eucheuma cottonii*. Construction of prokaryotic metagenome library was performed on a collection of DNA fragments digested with SfiI restriction enzyme. Then, the DNA fragments were ligated with

*λ TriplEx2 phage and the titer was determined. The highest titer was obtained from the ligation mixture with a DNA and phage ratio of 3:2 of 10.3×10^7 . Then the positive plaque was expressed through *E. coli* BM25.8 to find the gene encoding κ -carcinase enzyme. The positive activity of κ -carcinase enzyme was characterized by the formation of halo region. Then the recombinant clone that formed the halo was cultivated for κ -caraginase enzyme production, and tested for activity to determine the optimum temperature and pH. Based on the activity test of κ -caraginase extract against temperature and pH, 4 different optimum temperature and pH profiles were obtained, thus 4 kinds of genes encoding κ -caraginase enzyme have been obtained.*



Attribution-ShareAlike 4.0 International

Pendahuluan

Eucheuma cottonii merupakan salah satu Carragaenophytes, yaitu makroalga penghasil karaginan. Kadar karaginan dalam setiap spesies *Eucheuma* berkisar antara 54% - 73% tergantung pada jenis dan lokasinya (Wibowo, 2013). Di Indonesia kadar karaginan makroalga jenis *Eucheuma* berkisar antara 61,5 % - 67,5 %.

Karaginan adalah polimer galaktosa sulfat rantai lurus yang diekstrak dari *Eucheuma cottonii* dan merupakan sumber karbon penting bagi mikrobiota perairan heterotropik (Prabha, Vasuki, KayalVizhi, & Manikandan, 2018). Karaginan merupakan koloid hidrofilik, substansi yang bila berinteraksi dengan air akan membentuk sistem koloid (Chauhan & Saxena, 2016). Koloid hidrofilik sangat penting karena keunikan susunan fisik dan kimianya sehingga banyak digunakan di berbagai bidang bioteknologi industri (Xiao et al., 2016).

Akibat ukuran molekul κ -karaginan yang besar dan kemampuannya yang rendah dalam menembus jaringan menyebabkan aplikasinya terbatas. Dalam bentuk oligosakaridanya yaitu Carrageenan Oligosaccharides (COs), mempunyai aktivitas fisik dan biologi yang bervariasi, termasuk anti tumor, anti oksidan, dan anti angiogenik. Dibandingkan dengan ι - dan λ -COs, κ -COs mempunyai aktivitas antioksidan yang paling tinggi (Zhu, Ni, Ning, Yao, & Du, 2018). Enzim κ - karaginase berperan dalam memutus ikatan β -(1-4) pada κ -karaginan untuk menghasilkan κ -COs (Chauhan & Saxena, 2016).

Pada 2017, Kawaroe menjelaskan bahwa banyak mikrobiota yang dapat mendegradasi dinding sel makroalga. Namun selama ini hanya ada 1% dari jumlah keseluruhan bakteri yang dapat dikultur (cultivable) di dalam laboratorium. Metagenomik digunakan untuk isolasi DNA total bakteri dari sampel alam. Sehingga dapat mengetahui karakter bakteri dan kelimpahannya, serta ekspresi gen bakteri uncultivable dapat dilakukan (Nam et al., 2018). Efisiensi hasil konstruksi pustaka metagenom dinyatakan dalam titering. Titering dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti efisiensi ligasi, digesti dan transformasi. Keberhasilan konstruksi pustaka metagenomik apabila jumlah titer di atas standar minimal yaitu $1,7 \times 10^5$ (Fitriyah, 2017).

Dalam penelitian ini akan dilakukan eksplorasi gen penyandi enzim κ - karaginase yang didapat dari isolasi DNA metagenom prokariotik dari sampel permukaan

Eucheuma cottonii. Kelebihan dan keuntungan *Eucheuma cottonii* merupakan sumber κ -karaginan yang melimpah sehingga diharapkan bakteri yang terdapat gen penyandi enzim κ - karaginase ada di sana (Kawaroe, Pratiwi, & Sunudin, 2017).

Metode Penelitian

Isolasi DNA Metagenom Prokariot

Sampel DNA metagenom berupa makroalga *Eucheuma cottonii* yang diambil dari laut Madura. Untuk mendapatkan sampel prokariot maka dilakkan penyaringan dengan membran berukuran $3\mu\text{m}$ dan diambil supernatan yang lolos, kemudian disaring lagi menggunakan membran berukuran $0,2\mu\text{m}$ dan membran disuspensi dengan PBS. Isolasi DNA metagenom menggunakan TIANamp Bacterial DNA Kit. Hasil isolasi DNA metagenom prokariot divisualisasi dengan elektroforesis DNA.

Konstruksi Pustaka Metagenom

DNA metagenom hasil isolasi dilakukan digesti dengan enzim restriksi SfiI untuk mendapatkan fragmen DNA. Proses digesti dilakukan pada suhu 50°C dan diinkubasi selama 1, 2 dan 3 jam. Fragmen DNA yang diambil adalah fragmen DNA dengan ukuran 2-10 kB. Fragmen DNA tersebut kemudian diligasi dengan vektor bakteriofag λ TriplEx2. Dilakukan optimasi komposisi campuran antara fragmen DNA metagenom dan vektor untuk mendapatkan nilai titer yang tinggi. Komposisi campuran ligasi yang digunakan antara DNA dan vektor adalah 1:2, 1:1 dan 3:2. Kemudian dilakukan packaging in vitro untuk mendapatkan fag utuh. Transduksi dilakukan ke dalam inang *E.coli* XL-1Blue. Blue-white screening dalam media yang mengandung MgSO_4 digunakan untuk memastikan adanya DNA insert dalam vektor.

Seleksi Klon Rekombinan dengan Aktivitas κ -Karaginase

24 plak putih dari analisis Blue-white screening diambil untuk ditransduksikan ke dalam *E.coli* BM25,8 untuk dilakukan untuk menemukan aktivitas κ -karaginase. Media yang digunakan adalah media LB padat yang mengandung 0,5% κ -karaginan, 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan 0,001% FeCl_3 .

Karakterisasi Ekstrak κ -Karaginase

Klon rekombinan yang menghasilkan daerah halo dilakukan kultivasi untuk produksi enzim κ -karaginase. Kultivasi dilakukan dengan melakukan shaking pada media LB cair dengan kecepatan 200 rpm dan suhu 31°C sampai nilai OD600 adalah 2,1. Kemudian hasil inokulasi diambil 200 μl untuk dipindahkan di media produksi berupa LB cair yang mengundung 0,1% κ - karaginan, 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan 0,001% FeCl_3 . Shaking dilakukan selama 12 jam untuk kemudian ditambahkan IPTG sebesar 1%. Lalu dilakukan shaking lanjutan selama 6 jam. Hasil produksi disentrifugasi dengan kecepatan 2.000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan pellet sel. Pellet sel disuspensi dengan PBS dan dilakukan sonikasi selama 10 menit. Ekstrak κ - karaginase diuji aktivitasnya dengan metode DNS pada suhu 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80°C . Selain itu juga diuji aktivitasnya pada pH 4, 5, 6, 7, 8 dan 9. Buffer yang digunakan untuk pH 4-7 adalah buffer fosfat sitrat, sedangkan pH 8-9 menggunakan buffer Tris-HCl.

Hasil dan Pembahasan

Isolasi DNA Metagenom Prokariot

Penyaringan dengan membran ukuran $3\mu\text{m}$ dan $0,2\mu\text{m}$ berfungsi untuk mendapatkan sampel prokariot karena ukuran prokariot berkisar antara $0,2$ sampai $3\mu\text{m}$. Setelah didapatkan suspensi bakteri dalam buffer PBS, dilakukan pengukuran nilai OD600 untuk memperkirakan jumlah sel bakteri. Nilai absorbansi didapatkan sebesar $0,0989$. Syarat jumlah sel bakteri yang direkomendasikan kit adalah absorbansi $0,001 - 0,125$. Hasil isolasi DNA metagenom divisualisasi dengan elektroforesis DNA (Gambar 1).

Metagenom hasil isolasi. Lane 1 dan 2 berturut-turut adalah DNA metagenom dari hasil elusi pertama dan kedua

Gambar 1. Visualisasi DNA



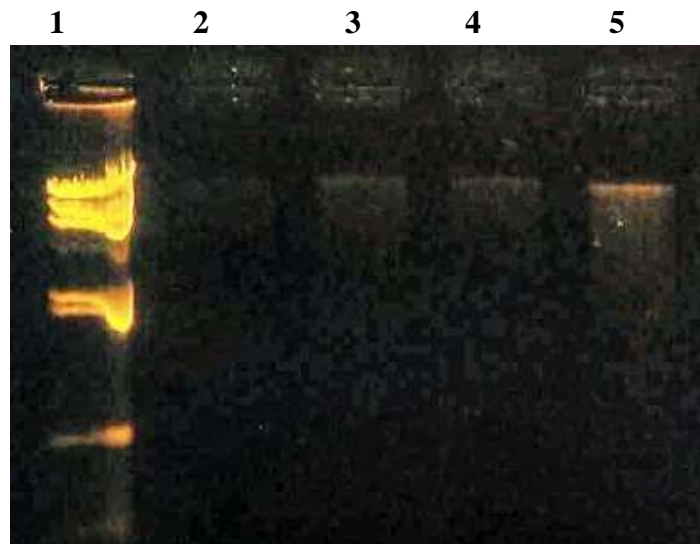
Konstruksi Pustaka Metagenom

Hasil isolasi DNA metagenom didigesti dengan enzim SfiI. Visualisasi tiga variasi waktu dapat dilihat pada Gambar 2. Enzim SfiI dipilih karena memiliki kemampuan restriksi 8 pasang basa spesifik dan bersifat jarang memotong sehingga mencegah terjadinya kemungkinan pemotongan gen target secara internal. Inkubasi dilakukan pada suhu optimum enzim SfiI yaitu 50°C . Berdasarkan hasil digesti tersebut, DNA dengan ukuran $2\text{ kB} - 10\text{ kB}$ diambil untuk disisipkan pada vektor $\lambda\text{triplEx2}$. Pemilihan panjang $2\text{ kB} - 10\text{ kB}$ berdasarkan kemampuan fag dalam menampung insert sampai 13 kB (Zelvi, Suryani, & Setyaningsih, 2017).

Kemudian fragmen DNA metagenom yang didapatkan diligasi dengan vektor $\lambda\text{TriplEx2}$. Untuk tujuan optimalisasi ligasi, dilakukan 3 variasi ligasi dengan perbandingan DNA dan vektor berturut-turut $1:2$, $1:1$ dan $3:2$. Selain itu juga dibuat kontrol positif menggunakan DNA insert dari Kit SMART library construction kit dan kontrol negatif berupa E.coli tanpa insert (Gambar 3). Dari kedua kontrol tersebut dapat

dibedakan bentuk plak dan koloni bakteri *E.coli*. Plak berwarna putih dan warna putih akan semakin jelas seiring berjalannya hari, sedangkan koloni *E.coli* diameternya akan bertambah seiring berjalannya hari.

Produk ligasi perlu dilakukan packaging menjadi bakteriofag utuh. Produk packaging diencerkan 1 : 1.000.000 yang bertujuan agar plak yang dihasilkan tidak tumpang tindih atau menyatu sehingga memudahkan proses seleksi.



Gambar 2.

Elektroforesis fragmen DNA metagenom prokariot hasil digesti dengan enzim restriksi *Sfi*I A&B. Lane 1 : marker restriksi λ /HindIII. Lane 2, 3, 4 dan 5 adalah waktu inkubasi proses digesti berturut-turut 0, 1, 2, dan 3 jam

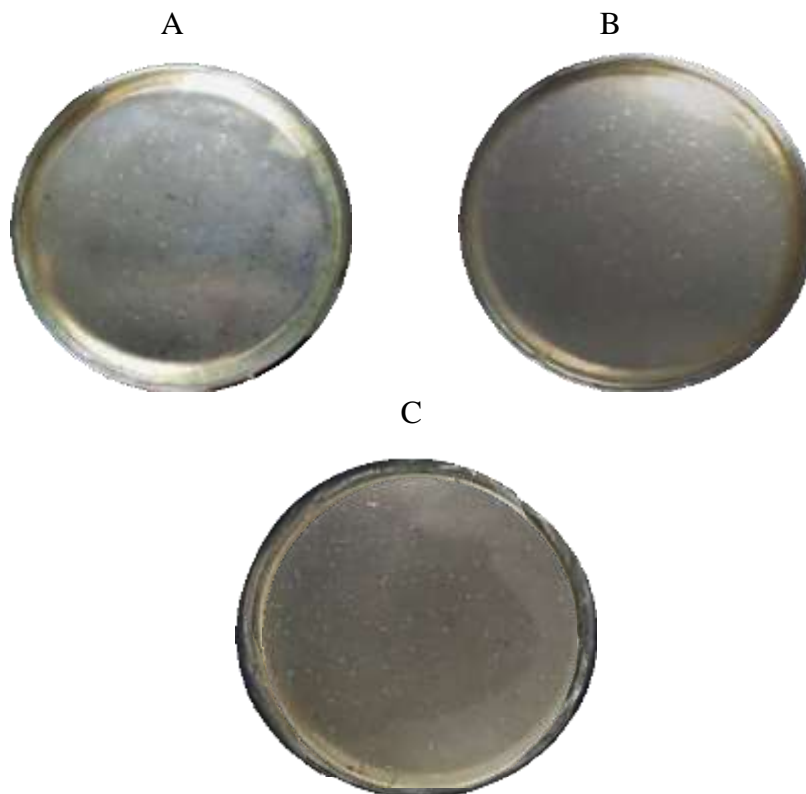


Gambar 3.

Kontrol positif dan negatif untuk analisis blue-White Screening. A : kontrol positif berupa bakteri *E.coli* XL-1Blue yang disisipi DNA insert dari Kit yang

ditumbuhkan pada media LB/MgSO₄ dengan IPTG dan X-Gal. B : kontrol negatif berupa bakteri E.coli XL-1Blue yang ditumbuhkan pada media LB/MgSO₄.

Untuk mengetahui inang manakah yang membawa fag dengan insert dan tanpa insert, dilakukan seleksi dengan metode blue-white screening karena fag λ TriplEx2 mengkode sintesis enzim β -galaktosidase (Buwono, 2017). Enzim β -galaktosidase akan memecah substrat laktosa atau 5-bromo-4-kloro-3-indolilbeta-D-galaktopiranosid (X-gal). Zat warna biru akan dilepas pada proses hidrolisis X-gal oleh β -galaktosidase menjadi galaktosa dan 5.5'-dibromo-4.4'-dikloro-indigo. Dalam pengamatannya akan terbentuk plak berwarna biru. Sedangkan fag dengan insert tidak akan dapat mengkode enzim β -galaktosidase sehingga akan tampak plak berwarna putih.



Gambar 4

Hasil ligasi pada 3 macam campuran ligasi. A, B dan C berturut-turut adalah perbandingan jumlah DNA metagenom dan fag 1:2, 1:1 dan 2:3

Untuk mengetahui efisiensi ligasi, dilakukan penghitungan titer. Dihitung jumlah plak yang terbentuk pada setiap komposisi campuran ligasi (Gambar 4). Hasil perhitungan titer pada setiap komposisi campuran ligasi ada pada Tabel 1.

Tabel 1.

Hasil perhitungan titering 3 macam komposisi campuran ligasi

Campuran Ligasi	Perbandingan DNA dan fag	Titer (pfu/mL)*
-----------------	--------------------------	-----------------

I	1 : 2	$\frac{192 \times 1.000.000}{2.000} \times 10^3 = 9,6 \times 10^7$
II	1 : 1	$\frac{107 \times 1.000.000}{2.000} \times 10^3 = 5,35 \times 10^7$
III	3 : 2	$\frac{206 \times 1.000.000}{2.000} \times 10^3 = 10,3 \times 10^7$

* $\text{pfu/mL} = \frac{\text{jumlah plak} \times \text{faktor pengenceran} \times 10^3}{\text{larutan untuk plating}}$

Seleksi Klon Rekombinan dengan Aktivitas κ -Karaginase

Dipilih 24 fag yang diambil dari hasil blue-white screening dan ditransduksikan ke *E.coli* BM25.8. *E.coli* BM25.8 rekombinan akan dilakukan streak pada media LB yang telah ditambahkan substrat berupa κ -karaginan. Enzim κ -karaginase akan memotong polimer κ -karaginan menjadi κ -COS. Aktivitas κ -karaginase ditandai dengan adanya daerah halo yang terbentuk (Gambar 5).



Gambar 5

Hasil screening menggunakan substrat κ -karaginase dengan pewarnaan congo red 1%. Panah hitam menunjukkan koloni dengan daerah halo sedangkan panah putih menunjukkan koloni tanpa daerah halo. A merupakan koloni yang memiliki daerah halo sedangkan B adalah koloni tanpa daerah halo

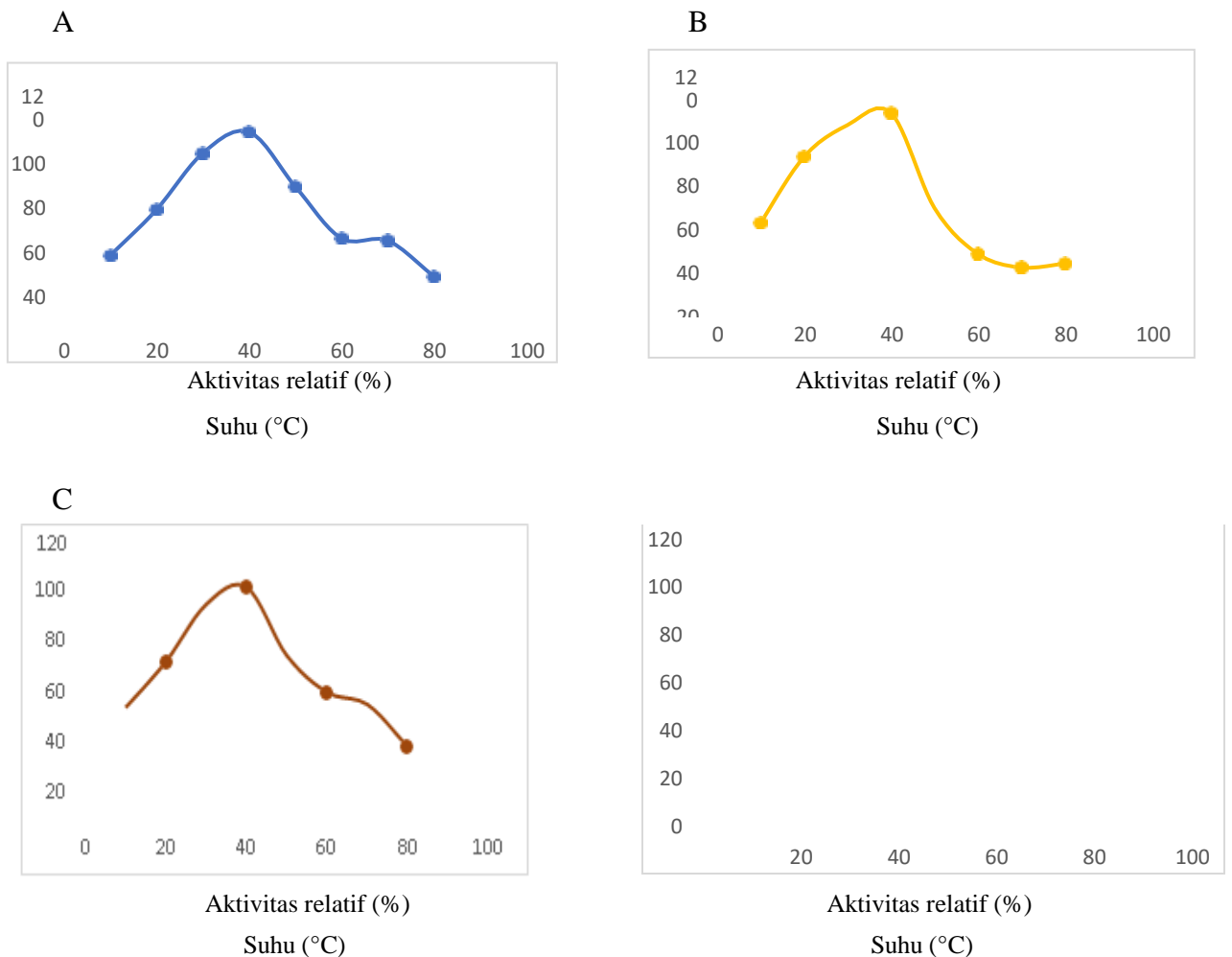
Karakterisasi Ekstrak κ -Karaginase

Karakterisasi ekstrak κ -karaginase ditentukan berdasarkan aktivitas ekstrak κ -karaginase terhadap suhu dan pH. Ekstrak κ -karaginase didapat dari koloni yang mengandung gen penyandi enzim κ - karaginase yang menghasilkan daerah halo.

Diambil 4 koloni dengan daerah halo untuk mengamati perbedaan karakteristiknya. Selanjutnya, masing-masing ekstrak κ - karaginase diberi nama ekstrak κ - karaginase A, B, C dan D.

Aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang digunakan untuk membebaskan 1 μ mol gula pereduksi. Pada setiap pengukuran aktivitas ekstrak κ - karaginase digunakan kontrol berupa ekstrak κ -karaginase yang sudah didenaturasi untuk menghitung adanya gula pereduksi yang masih tersisa pada ekstrak κ -karaginase. Aktivitas diukur pada rentang suhu antara 10-80°C. Profil masing-masing aktivitas relatif dari keempat ekstrak κ -karaginase dapat dilihat pada Gambar 6.

Gambar 6
Grafik profil suhu optimum ekstrak κ -karaginase dari klon A, B, C dan D

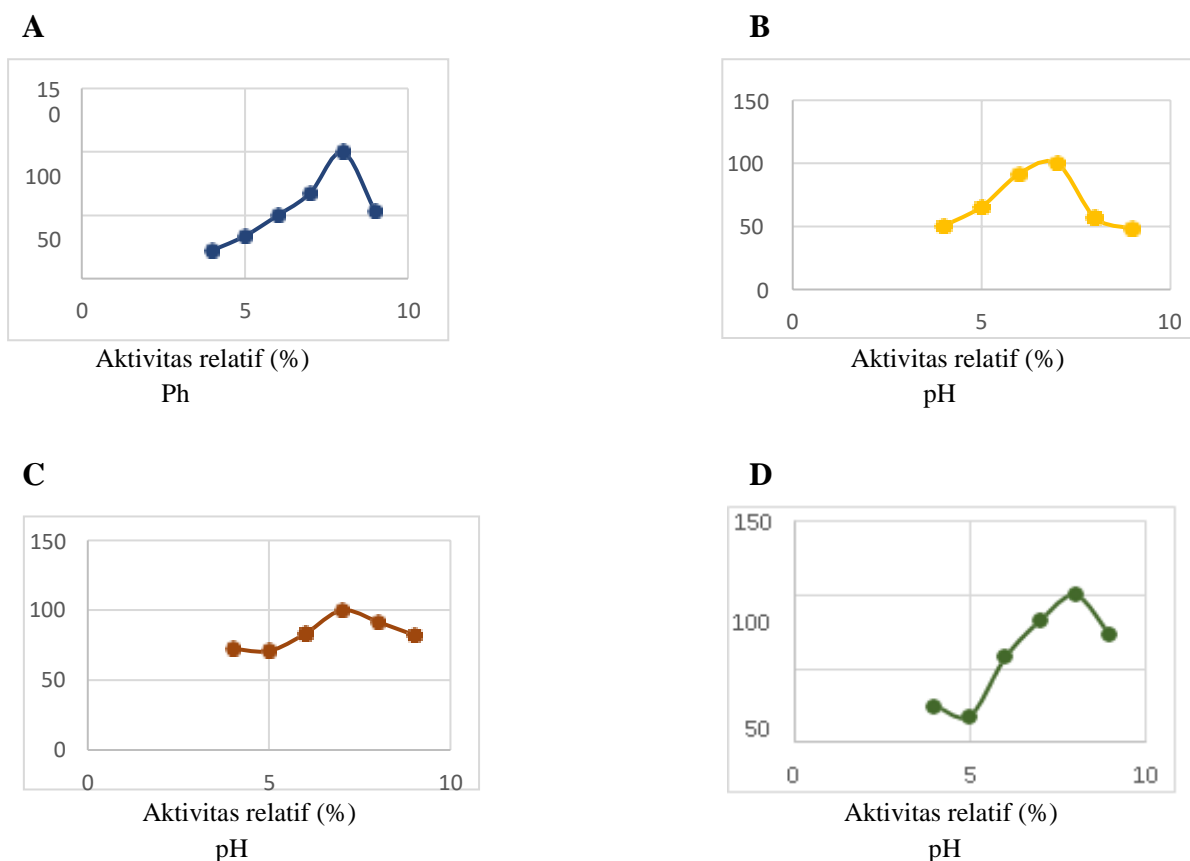


Aktivitas ekstrak κ -karaginase A mengalami kenaikan pada rentang suhu 10-40°C. Namun pada suhu 50°C sampai 80°C terjadi penurunan. Hal ini tidak jauh

berbeda dengan ekstrak κ -karaginase B dan C yang profilnya mirip dengan ekstrak κ -karaginase A. Sedangkan pada ekstrak κ -karaginase D, aktivitas cenderung stabil pada suhu rendah dan mengalami kenaikan yang signifikan pada suhu 40°C serta penurunan pada tingkat suhu yang lebih tinggi. Namun, aktivitas ekstrak κ -karaginase D pada suhu 50°C masih mempunyai aktivitas di atas 80% sehingga bisa dikategorikan sebagai enzim thermostabil. Keempat profil suhu optimum ekstrak κ -karaginase tersebut menunjukkan pada suhu 40°C.

Sedangkan aktivitas ekstrak κ -karaginase terhadap pH diukur pada pH 4, 5, 6, 7, 8 dan 9. pH 4-7 menggunakan buffer sitrat-fosfat, sedangkan pH 8-9 menggunakan buffer Tris HCl. Aktivitas relatif ekstrak κ -karaginase dalam berbagai variasi pH dapat dilihat pada Gambar 7.

Gambar 7.
Grafik profil pH optimum ekstrak κ -karaginase dari klon A, B, C dan D



Ekstrak κ -karaginase A dan D mempunyai aktivitas optimum pada pH 8, sedangkan ekstrak enzim κ -karaginase B dan C mempunyai aktivitas optimum pada pH 7. Keempat aktivitas ekstrak κ -karaginase cenderung mengalami kenaikan mulai pH 4 sampai pH 7. Suhu optimum keempat ekstrak karaginase adalah 40°C. pH optimum 2

ekstrak κ -karaginase adalah 7, sedangkan 2 ekstrak κ -karaginase yang lain adalah 8. Walaupun demikian, diketahui bahwa masing-masing ekstrak κ -karaginase mempunyai profil yang berbeda. Berdasarkan hal tersebut, keempat ekstrak κ -karaginase berasal dari gen yang berbeda.

Kesimpulan

Pustaka metagenom prokariot yang menempel pada permukaan *Eucheuma cottonii* memberikan nilai titer $10,3 \times 10^7$, tergolong pustaka metagenom dengan titer tinggi (high titer). Dari pustaka metagenom yang ada didapatkan 4 klon rekombinan yang menunjukkan aktivitas κ -karaginase dengan profil suhu dan pH optimum yang berbeda-beda.

Penelitian selanjutnya disarankan untuk dilakukan analisis SDS-PAGE dan zimogram untuk memperkirakan berat molekul enzim κ -karaginase. Selain itu perlu dilakukan isolasi plasmid rekombinan dan sekuensing gen untuk mengetahui urutan gen penyandi enzim κ -karaginase. Eksplorasi lebih lanjut dari pustaka metagenom yang telah didapat untuk mendapatkan gen-gen penyandi enzim yang lain.

Bibliografi

- Buwono, Ibnu Dwi. (2017). *Buku Ajar Aplikasi Teknologi DNA Rekombinan untuk Perakitan Konstruksi Vektor Ekspresi Ikan Lele Transgenik*. Deepublish.
- Chauhan, Prakram Singh, & Saxena, Arunika. (2016). Bacterial carrageenases: an overview of production and biotechnological applications. *3 Biotech*, 6(2), 146.
- Fitriyah, Umaya Rizka. (2017). *Isolasi dan identifikasi molekuler bakteri endofit akar mangrove *Sonneratia alba* penghasil enzim gelatinase*. Universitas Brawijaya.
- Kawaroe, M., Pratiwi, I., & Sunudin, A. (2017). Isolation and characterization of marine bacteria from macroalgae *Gracilaria salicornia* and *Gelidium latifolium* on agarolytic activity for bioethanol production. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 65(1), 12025. IOP Publishing.
- Nam, Bo Hye, Jang, Jisung, Caetano-Anolles, Kelsey, Kim, Young Ok, Park, Jung Youn, Sohn, Hawsun, Yoon, Sook Hee, Kim, Heebal, & Kwak, Woori. (2018). Microbial community and functions associated with digestion of algal polysaccharides in the visceral tract of *Haliotis discus hannai*: Insights from metagenome and metatranscriptome analysis. *Plos One*, 13(10), e0205594.
- Prabha, D. R. A. Lakshmi, Vasuki, A., KayalVizhi, R., & Manikandan, T. (2018). *Identification of Endophytic Bacteria From *Murraya koenigii* And Their L-Asparaginase Activity*.
- Wibowo, Pascalis Danny Kristi. (2013). *Variasi Karaginan (*Eucheuma cottonii* Doty) pada Proses Pembuatan Bakso Daging Sapi dengan Bahan Pengawet Tanin dari Pisang Kluthuk*. UAJY.
- Xiao, Anfeng, Xu, Caiyun, Lin, Yan, Ni, Hui, Zhu, Yanbing, & Cai, Huinong. (2016). Preparation and characterization of κ -carrageenase immobilized onto magnetic iron oxide nanoparticles. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19, 1–7.
- Zelvi, Mustika, Suryani, Ani, & Setyaningsih, Dwi. (2017). Hidrolisis *Eucheuma cottonii* Dengan Enzim K-Karagenase Dalam Menghasilkan Gula Reduksi Untuk Produksi Bioetanol. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 27(1).
- Zhu, Benwei, Ni, Fang, Ning, Limin, Yao, Zhong, & Du, Yuguang. (2018). Cloning and biochemical characterization of a novel κ -carrageenase from newly isolated marine bacterium *Pedobacter hainanensis* NJ-02. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 1331–1338. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.040>